

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS ARARAQUARA**

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DAS  
PLACAS DE PEYER NA MODULAÇÃO DAS  
RESPOSTAS Th1/Th2 EM CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *Yersinia pseudotuberculosis***

**ORIVALDO PEREIRA RAMOS**

**ARARAQUARA**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS ARARAQUARA**

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DAS  
PLACAS DE PEYER NA MODULAÇÃO DAS  
RESPOSTAS Th1/Th2 EM CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *Yersinia pseudotuberculosis***

**ORIVALDO PEREIRA RAMOS**

Tese apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor.

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. BEATRIZ MARIA MACHADO DE MEDEIROS**

**ARARAQUARA**

**2009**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Ramos, Orivaldo Pereira

R175i           Influência das células dendríticas das placas Peyer na modulação das respostas Th1/Th2 em camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis*. / Orivaldo Pereira Ramos. – Araraquara, 2009.  
123 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Beatriz Maria Machado de Medeiros

1. *Yersinia pseudotuberculosis*. 2. Células dendríticas. 3. Linfócitos.  
4. Imunologia. I. Medeiros, Beatriz Maria Machado de, orient.. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz Maria Machado de Medeiros  
(Orientador e Presidente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
(Membro Titular)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iracilda Zeppone Carlos  
(Membro Titular)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado  
(Membro Titular)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda de Freitas Aníbal  
(Membro Titular)

Araraquara, janeiro de 2009.

**TRABALHO** realizado no Laboratório de Imunologia Básica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara - SP, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através do auxílio à pesquisa Proc. nº 2007/00134-6.

**DEDICO** esse trabalho aos meus pais, Geraldo e Nair, pelo amor e pelos nobres ensinamentos recebidos;

Aos meus filhos, Guilherme e Leonardo, e a minha esposa Luciana, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela presença constante em minha vida;

À minha orientadora, Profa. Dra. Beatriz Maria Machado de Medeiros, pela orientação, auxílio constante e oportunidade de vivenciar a pesquisa, bem como pelo exemplo de dedicação profissional;

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Nather pela amizade, incentivo e apoio constante na realização desse trabalho;

À Profa. Dra. Celi Vasques Crepaldi pela amizade e pelo apoio recebido, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho;

À Profa. Dra. Maria Aparecida R. Lima Grande pela amizade e apoio na confecção desse trabalho;

À Valeria Aparecida de Araújo Mallavolta por todo o auxílio técnico recebido, incentivo e pela amizade construída;

Aos amigos e colegas de laboratório Aline Tansini, Luis Gustavo Silva Monnazzi e Juliana Silva Oliveira pelo auxílio técnico, companheirismo e amizade;

Aos professores Jorge Luiz Naliati Nunes, Silvia Zucchi Bailão e Margarete Dolores Marson Sanches do Centro Universitário Barão de Mauá pelo auxílio nos momentos de dificuldade;

Aos amigos Luiz Gustavo Borsetti Ballesteri e Juliana Cristina Cordeiro, do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, pela amizade e auxílios recebidos;

À biomédica Fabiana R. de Moraes pelo auxílio técnico nas análises de citometria de fluxo;

Aos professores, funcionários e amigos do curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia e do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, pela amizade e serviços prestados;

À FAPESP pelo auxílio financeiro;

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE FIGURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1. Fluxograma de trabalho .....	32
3.2. Animais.....	33
3.3. Amostras Bacterianas .....	33
3.4. Infecção experimental dos animais com as amostras de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	33
3.4.1. Reativação das amostras.....	33
3.4.2. Preparo do inóculo.....	34
3.4.3. Esquema de infecção .....	34
3.5. Obtenção e análise das células dendríticas .....	34
3.5.1. Obtenção e enriquecimento (Kadaoui e Corthésy, 2004).....	34
3.5.2. Análise fenotípica através de citometria de fluxo (Pulendram et al., 2001).....	35
3.5.3. Análise das moléculas de superfície através de citometria de fluxo .....	35
3.5.4. Determinação da produção de citocinas por ELISA. ....	36
3.5.5. Determinação da ativação de células T Ag-específicas.....	37
3.5.5.1. Preparo do Antígeno de <i>Yersinia</i> – HKY (“Heat-killed <i>Yersinia</i> ”).....	37
3.5.5.2. Imunização de camundongos com HKY para a obtenção dos linfócitos T antígeno-específicos .....	37
3.5.5.3. Obtenção e enriquecimento dos linfócitos T .....	37
3.5.5.4. Ensaio de proliferação de células T .....	38
3.6. Quantificação das sub-populações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas Th1 e Th2 através de citometria de fluxo (Morita et al., 1998) .....	39
3.6.1. Obtenção das células das placas de Peyer .....	39



3.6.2. Análise fenotípica dos linfócitos das placas de Peyer .....	39
3.6.3. Detecção das citocinas intracelulares IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.....	40
3.7. Análise estatística .....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1. Análise fenotípica das células dendríticas.....	42
4.2. Análise das moléculas de superfície das células dendríticas.....	47
4.3. Determinação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ no sobrenadante de cultura de células dendríticas.....	52
4.4. Determinação da ativação de células T Ag-específicas.....	65
4.5. Análise fenotípica dos linfócitos T das placas de Peyer.....	68
4.6. Detecção das citocinas intracelulares IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ dos linfócitos das placas de Peyer .....	73
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>104</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>123</b>
8.1. Parecer n° 07/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEP - Asparagina Endopeptidase  
APC – Célula Apresentadora de Antígeno  
BAB – “Blood Agar Base”  
BSA – “Bovine Serum Albumin”  
CD – “Cluster of Differentiation”  
CFSE – “Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester”  
DC – Célula Dendrítica  
DN – Duplo Negativa  
DO – Densidade Óptica  
EDTA – “Ethylenediamine Tetracetic Acid”  
ELISA – "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"  
FA – Adesão focal  
FACS – “Fluorescence-Activated Cell Sorting”  
FAE – Epitélio Intestinal Associado ao Folículo  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
FPB – Proteína Ligante de Fyn  
HEPES – "N 2 Hydroxyethylpiperazine N' 2 ethane sulfonic acid"  
HKY – “Heat-Killed *Yersinia*”  
IDC – Célula Dendrítica Intersticial  
IFN- $\gamma$  – Interferon-gama  
IFR - Região Interfolicular  
IL – Interleucina  
iNOS – “Inducible NO Synthase”  
IP – Índice de Proliferação  
kb – Quilobase  
kDa – Quilodalton  
LC – Célula de Langerhan  
LcrV – Antígeno V  
LPS – Lipopolissacarídeo  
LT – Linfócito T  
MAPK – “Mitogen-Activated Protein Kinases”  
MHC – “Major Histocompatibility Complex”

MLN – Linfonodos Mesentéricos  
moDC – Célula Dendrítica Derivada de Monócito  
NF- $\kappa$ B – “Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”  
NK – "Natural Killer"  
nm - Nanômetro  
NO – Óxido Nítrico  
PAMP – Padrão Molecular Associado ao Patógeno  
PBS – “Phosphate Buffered Saline”  
PE – Ficoeritrina  
pg – Picogramas  
pi – Pós infecção  
PMA – Forbol Miristato Acetato  
PP – Placa de Peyer  
PRR – “Pattern Recognition Receptor”  
pYV – Plasmídeo Yop Virulon  
RMIF – Razão das Medianas de Intensidade de Fluorescência  
SD – Desvio padrão  
SED – Dome Subepitelial  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SPF – “Specif Pathogen Free”  
SPRD – “Spectral red”  
TCR – Receptor de células T  
TLR – “*Toll Like* Receptor”  
TMB – Tetrametilbenzidina  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral-alfa  
TSB – “Tripic Soy Broth”  
TTSS – Sistema de Secreção do Tipo III  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia  
Yop – “*Yersinia* Outer Protein”  
YpkA – “*Yersinia* protein kinase A”

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número absoluto e percentual de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e das subpopulações CD11c<sup>+</sup>C11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*..... 44
- Tabela 2** – Percentual de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*..... 49
- Tabela 3** – Produção de IL-4 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle ..... 54
- Tabela 4** – Produção de IL-10 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle ..... 57
- Tabela 5** – Produção de IL-12 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle ..... 60
- Tabela 6** – Produção de TNF-α por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle ..... 63
- Tabela 7** – Análise da capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas das placas de Peyer através da determinação da proliferação de células T CD4<sup>+</sup> ..... 65
- Tabela 8** – Número absoluto de linfócitos T e das subpopulações CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ..... 70
- Tabela 9** – Detecção intracelular da citocina IL-2 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ..... 75

**Tabela 10** – Detecção intracelular da citocina IL-4 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ..... 79

**Tabela 11** – Detecção intracelular da citocina IL-10 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ..... 83

**Tabela 12** – Detecção intracelular da citocina IFN- $\gamma$  nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* ..... 88

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Número de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) (A) e subpopulações CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (B) e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> (C) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as amostras YpIII pIB1 e YpIII nos diferentes dias pós-infecção ..... 45
- Figura 2** – Principais alterações ocorridas no número de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e subpopulações CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> durante as infecções de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis* ..... 46
- Figura 3** – Percentual de células dendríticas expressando moléculas de MHC II (I-A/I-E) (A), B7.1 (CD80) (B), B7.2 (CD86) (C) e ICAM-1 (CD54) (D) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as amostras YpIII pIB1 e YpIII nos diferentes dias pós-infecção... 50
- Figura 4** – Principais alterações ocorridas no número de células dendríticas quanto à expressão de moléculas de MHC II, B7.1, B7.2 e ICAM-1 durante as infecções de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis* ..... 51
- Figura 5** – Concentrações de IL-4 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*..... 55
- Figura 6** – Concentrações de IL-10 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*..... 58
- Figura 7** – Concentrações de IL-12 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.....61
- Figura 8** – Concentrações de TNF-α em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*..... 64

<b>Figura 9</b> – Influência da infecção por <i>Y. pseudotuberculosis</i> com as amostras YpIII pIB1 e YpIII sobre a capacidade de células dendríticas estimularem a proliferação de células T CD4 <sup>+</sup> em camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B).....	67
<b>Figura 10</b> – Quantificação dos linfócitos T (LT) e subpopulações, LT-CD4 e LT-CD8, durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII. Camundongos BALB/c (A e B) e C57BL/6 (C e D) foram sacrificados no 1º, 3º e 5º dias após a infecção e os LT das placas de Peyer e suas subpopulações quantificadas através de citometria de fluxo.....	71
<b>Figura 11</b> – Principais alterações ocorridas no número de linfócitos T CD4 e CD8 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	72
<b>Figura 12</b> – Cinética da produção de citocina IL-2 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	76
<b>Figura 13</b> – Principais alterações da produção de IL-2 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	77
<b>Figura 14</b> – Cinética da produção de citocina IL-4 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	80
<b>Figura 15</b> – Principais alterações da produção de IL-4 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	81
<b>Figura 16</b> – Cinética da produção de citocina IL-10 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	84

**Figura 17** – Principais alterações da produção de IL-10 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*..... 85

**Figura 18** – Cinética da produção de citocina IFN- $\gamma$  pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis* ..... 89

**Figura 19** – Principais alterações da produção de IFN- $\gamma$  pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*..... 90



## RESUMO

*Yersinia pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são patógenos que causam distúrbios gastrointestinais. Estudos utilizando infecção *in vitro* demonstraram que *Y. enterocolitica* pode ter como alvo as células dendríticas (DCs), afetando várias de suas funções, incluindo sua maturação e produção de citocinas, e, conseqüentemente, contribuindo para a diminuição da ativação de células T CD4<sup>+</sup>. O objetivo deste estudo foi investigar o papel das células dendríticas das placas de Peyer (PP) na determinação do padrão de resposta imune, Th1 e Th2, durante a infecção por via intragástrica de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) com a amostra virulenta de *Y. pseudotuberculosis* (YpIII pIB1 – Yp<sup>+</sup>) ou seu par isogênico, curado do plasmídeo de virulência (YpIII – Yp<sup>-</sup>). As DCs das PP foram obtidas no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia pós-infecção, quantificadas e analisadas quanto às suas sub-populações, expressões de moléculas de superfície e capacidade imunoestimulatória por citometria de fluxo, e quanto à secreção de citocinas (IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) por ELISA. Os linfócitos das PP também foram obtidos no mesmo período e tiveram suas sub-populações e o padrão de citocinas intracelulares Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ ) analisado por citometria de fluxo. A infecção por Yp<sup>+</sup> reduziu o número de DCs no 1<sup>o</sup> dia pós-infecção e aumentou, no período inicial, a expressão de B7.1 e B7.2 nos camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6 reduziu o número de DCs durante todo o período analisado, aumentou a expressão de B7.1 e B7.2 no período inicial e a expressão de ICAM-1. A infecção por ambas as amostras provocou redução da sub-população CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> e da expressão de MHC II nas duas linhagens de animais, aumentou a sub-população CD11b<sup>+</sup> nos animais suscetíveis e diminuiu nos animais resistentes. Os animais estudados não apresentaram diferenças importantes quanto à secreção de citocinas pelas DCs de PP e ambos tiveram aumentos das citocinas pesquisadas durante a infecção pelas amostras bacterianas. A amostra virulenta aumentou a capacidade das DCs de PP dos animais C57BL/6 em induzir a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos. Os camundongos C57BL/6 apresentaram reduções no número de LT e na produção das citocinas intracelulares durante a infecção por ambas as amostras, quando comparados aos animais controles. Os camundongos BALB/c, por sua vez, apresentaram uma maior relação LT-CD4/LT-CD8 e maior produção de citocinas intracelulares nos LT. Esses resultados demonstraram que a infecção pela amostra virulenta levou à maturação inicial das DCs de PP nos camundongos BALB/c e C57BL/6 e aumentou a capacidade das DCs de PP dos animais C57BL/6 em induzir a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos. Também demonstrou que a existência de um número maior de DCs da

sub-população CD11b<sup>+</sup> parece ser determinante do padrão de resistência dos camundongos C57BL/6. De um modo geral, os resultados obtidos quanto à produção das citocinas intracelulares presentes nos linfócitos T das PP demonstraram não haver uma polarização da resposta para nenhum dos perfis (Th1 ou Th2) durante a infecção com *Yersinia pseudotuberculosis*. Além disso, confirmaram uma maior produção de citocinas antagonistas pelos camundongos BALB/c e, ainda, os resultados obtidos com a amostra Yp<sup>-</sup> mostraram que outros fatores de virulência, além das Yops, interferem na produção e secreção das citocinas.

**Palavras chaves:** *Yersinia pseudotuberculosis*, células dendríticas, linfócitos T, placas de Peyer, citocinas, ativação de célula T

## ABSTRACT

*Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* are pathogens that cause gastrointestinal disorders. Studies using *in vitro* infection demonstrated that *Y. enterocolitica* can have as a target dendritic cells (DCs), affecting several of its functions, including their maturation and production of cytokines, and, consequently, contributing to the diminished activation of the T CD4<sup>+</sup> cells. The aim of this study was to investigate the role of dendritic cell from Peyer's patches (PP) in determining of immune response pattern, Th1 and Th2, during infection by the intragastric route in susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice with a virulent sample of *Yersinia pseudotuberculosis* (YpIII pIB1 – Yp<sup>+</sup>) or its isogenic pair, cured of the virulence plasmid (YpIII – Yp<sup>-</sup>). The PP DCs were obtained on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> days post-infection, quantified and analyzed as far as their subpopulations, expressions of surface molecules and immunostimulatory capacity by flow cytometry, and the cytokines secretion (IL-4, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) by ELISA. The PP lymphocytes were also obtained in the same period, and had their subpopulations and the pattern of intracellular Th1/Th2 cytokines (IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$ ) analysed by flow cytometry. The infection by Yp<sup>+</sup> reduced the number of DCs on the 1<sup>st</sup> day post-infection and increased, in the initial period, the expression of B7.1 and B7.2 in BALB/c. In C57BL/6 mice reduced the number of DCs throughout the study period, increased the expression of B7.1 and B7.2 in the initial period and the expression of ICAM-1. The infection by both samples reduced CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> subpopulation and expression of MHC II in both animals, increased CD11b<sup>+</sup> sub-population in susceptible animals and reduced the same sub-population in resistant animals. The studied animals did not present important differences as far as secretion of cytokines by the DCs of PP and both had increases of the researched cytokines during the infection by bacterial samples. The virulent sample increased the capacity of DCs from PP of the C57BL/6 animals to induce the activation of antigen-specific T lymphocytes. The C57BL/6 mice showed reductions in the number of T lymphocytes and in the production of intracellular cytokines during infection by both samples, when compared to control animals. The BALB/c mice showed a higher relation of LT-CD4/LT-CD8 and a higher production of intracellular cytokines in the T lymphocytes. These results demonstrated that infection by virulent sample let to the initial maturation of DCs in the PP of the BALB/c and C57BL/6 mice and increased the capacity of DCs from PP of the C57BL/6 animals to induce activation of antigen-specific T lymphocytes. Also showed that a larger number of CD11b<sup>+</sup> subpopulation appears to be determinant of the resistance pattern of the C57BL/6 mice. Overall, the results on the production of intracellular cytokines

in T lymphocytes of PP demonstrated that there is not a polarized response for any of the profiles (Th1 or Th2) during infection with *Y. pseudotuberculosis*. Moreover, confirmed the larger production of antagonists cytokines by BALB/c mice, and the results obtained with the Yp<sup>-</sup> sample showed that other virulence factors, in addition to the Yops, interfere in the production and secretion of cytokines.

**Keywords:** *Yersinia pseudotuberculosis*, Dendritic cells, T lymphocytes, Peyer's patch, cytokines, T-cell activation

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Yersinia* fazem parte da família *Enterobacteriaceae* e compreendem 11 espécies. São coco-bacilos Gram-negativos, não esporulados, não encapsulados, oxidase-negativos, anaeróbios facultativos que fermentam a glicose e predominantemente extracelulares (ROSQVIST et al., 1988; SIMONET et al., 1990).

*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e alguns sorogrupos de *Y. enterocolitica* são agentes causadores de doenças em alguns animais e no homem. Já as demais espécies e sorogrupos de *Y. enterocolitica* são microrganismos ambientais ou patógenos oportunistas (BRUBAKER, 1991).

*Y. pestis* é o patógeno responsável pelo desenvolvimento da peste bubônica, uma doença sistêmica fatal, causada tanto pelo contato com roedores infectados ou suas pulgas, como pelo contato com o indivíduo doente (CARNIEL, 2002). *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são enteropatógenos causadores de distúrbios gastrointestinais. As infecções por esses microrganismos são causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados, e desencadeiam enterite e linfadenite, geralmente autolimitadas no homem (BOTTONNE, 1997).

Apesar das diferentes formas de invasão do hospedeiro e da severidade de suas doenças, as três espécies apresentam, em comum, o tropismo pelo tecido linfóide (BRUBAKER, 1991). Além disso, a *Yersinia* apresenta uma notável capacidade de resistir à resposta imune primária do hospedeiro (NEUTRA et al., 1996) e é capaz de invadir os tecidos através de interações com as mucosas (BOTTONNE, 1997).

No intestino delgado os microrganismos invadem a barreira intestinal passando através das células M, células especializadas do epitélio associado ao folículo (FAE) que atuam na captura de antígenos. Depois de poucas horas após a infecção oral, a *Yersinia* é encontrada dentro das células M (HANSKI et al., 1989; GRUTZKAU et al., 1990; AUTENRIETH e FIRSHING, 1996). Após a invasão do epitélio intestinal, a bactéria replica dentro dos folículos linfóides conhecidos como placas de Peyer (PP) e também se espalha para os linfonodos mesentéricos (MLN), desencadeando uma linfadenite mesentérica. As cepas virulentas proliferam no tecido linfóide associado ao intestino e lâmina própria, onde causam destruição tecidual localizada, levando à formação de microabscessos (ROBINS-BROWNE et al., 1985; TZIPORI et al., 1987).

*Yersinia* também pode disseminar-se através da lâmina própria para as vilosidades adjacentes e através da linfa para sítios mais remotos. *Y. pseudotuberculosis* pode ganhar a corrente sanguínea e causar septicemia, sendo este fato de ocorrência mais rara em humanos.

Em indivíduos com hemocromatose e imunodeprimidos, ela pode disseminar-se sistemicamente e ser fatal em 70% dos casos (ABBOTT et al., 1986). Em roedores pode disseminar-se do trato intestinal para o baço, o fígado e os pulmões (PUJOL e BLISKA, 2005).

Assim como outras enterobactérias, a *Yersinia* apresenta vários fatores de virulência que contribuem para a sua evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, sua sobrevivência e disseminação no organismo. Esses fatores de virulência codificados por genes cromossomais (*inv*, *ail*, *yst*, *irp2* e *myf*) e por genes plasmideais (*yadA* e *yop*) promovem sua invasão e paralisam especialmente as funções do sistema complemento e da fagocitose (WUORELA e GRANFORS, 1998; CARNIEL, 2002).

As três espécies patogênicas de *Yersinia* possuem um plasmídeo de virulência de 70-kb, altamente homólogo, chamado pIB1 em *Y. pseudotuberculosis*, pYV em *Y. enterocolitica* e pCD1 em *Y. pestis* (PORTNOY et al., 1981). Estes plasmídeos são importantes fatores de virulência dessas espécies, uma vez que codificam proteínas estruturais (“Yop secretion” - Ysc), reguladoras (“Low calcium response” - Lcr) e efetoras (“Yersinia outer proteins” - Yops) de um sistema de secreção do tipo III (TTSS). Este sistema de secreção, presente nesses microrganismos, permite à *Yersinia* secretar e translocar as Yops para dentro das células do hospedeiro (CORNELIS, 2002). No interior da célula do hospedeiro, as Yops efetoras interferem com as vias de sinalização envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina, fagocitose, apoptose e resposta inflamatória (NAVARRO et al., 2005).

Além do TTSS e das Yops, este plasmídeo codifica, ainda, a proteína YadA e o antígeno V (LcrV) (PERRY e FETHERSTON, 1997; CORNELIS et al., 1998).

A proteína YadA é uma adesina não fimbrial que possui, além da função na adesão celular, a capacidade de proteger o patógeno contra a resposta imune humoral, bem como contra defensinas e lise por proteínas do sistema complemento (HEESEMAN et al., 2006).

O LcrV é secretado no meio extracelular, onde atua inibindo a inflamação através da interação com o receptor *Toll-like* do tipo 2 (TLR-2), suprimindo as produções de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), e induzindo a produção de interleucina-10 (IL-10) (BRUBAKER, 2003)

As Yops constituem um conjunto de 11 proteínas que desempenham a principal função na virulência da *Yersinia*, que é a de inibir a resposta imune do hospedeiro. Elas possibilitam à bactéria evadir-se da fagocitose e morte por neutrófilos e macrófagos, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e desencadear a apoptose de fagócitos (HARTLAND e ROBINS-BROWNE, 1998; CORNELIS, 2002; TRÜLZSCH et al., 2005). Essas proteínas

são sintetizadas apenas em meio deficiente de cálcio e na fase exponencial de crescimento a 37°C, sendo, portanto, reguladas por estímulos extracelulares de cálcio e de temperatura (HOLMSTRÖM et al., 1995; BOTTONE, 1997).

Enquanto algumas Yops possuem ações efetoras dentro da célula hospedeira, outras, como a YopB e YopD, são secretadas no meio extracelular e têm como função translocar as efetoras para o interior das células eucarióticas. Acredita-se que, pelo menos, seis proteínas efetoras sejam ativas na célula do hospedeiro: YopH, YopE, YopJ (chamada de YopP em *Y. enterocolitica*), YpkA (chamada de YopO em *Y. enterocolitica*), YopM e YopT (CORNELIS e WOLF-WATZ, 1997; CORNELIS et al., 1998; NAVARRO et al., 2005).

A atividade de YopE, uma proteína de 25 kDa, está associada com a despolimerização do citoesqueleto da célula do hospedeiro, o que dificulta, portanto, a fagocitose da bactéria (ROSQVIST et al., 1991).

As funções de YopT (35,5 kDa) não são muito claras, porém, tem sido demonstrado que elas são semelhantes às da YopE (IRIARTE e CORNELIS, 1998; CORNELIS, 2002).

A YopE e a YopT podem afetar diferentes vias de sinalização celular a fim de potencializar o efeito citotóxico da bactéria e assegurar a sobrevivência do patógeno no tecido linfóide (JURIS et al., 2002).

A YopH é uma tirosina fosfatase com 51 kDa que desfosforiliza a p130<sup>Cas</sup>, a p125<sup>FAK</sup>, a paxilina e a proteína ligante de Fyn (FBP), todas elas proteínas tirosina-fosforiladas encontradas nos complexos de adesão focal (FA). A atividade de YopH parece causar uma desunião nesses complexos, diminuindo a entrada da bactéria nas células HeLa ou a sua fagocitose por macrófagos; além disso, também inibe o “burst” oxidativo (BLACK e BLISKA, 1997; PERSSON et al., 1997; BLACK et al., 1998; HAMID et al., 1999). Ainda, a YopH pode funcionar cooperativamente com a YopE na inibição da fagocitose por neutrófilos (RUCKDESCHEL et al., 1996). Sauvonnet et al. (2002a) mostraram a possível atuação da YopH na inativação da via do fosfatidilinositol-3 quinase com a conseqüente supressão, nos macrófagos, da expressão da proteína 1 quimioatratante de monócitos (MCP-1) e da proliferação de células T. Alonso et al. (2004) mostraram que a YopH inibe a sinalização pelo receptor de células T (TCR), promovendo a desfosforilação de Lck na posição Tyr-394 e, conseqüentemente, paralisando as células T e inibindo o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa.

A YpkA (“*Yersinia* protein kinase A”) é outra Yop com 81 kDa, que mostra extensa homologia com proteínas eucarióticas, mais propriamente com a família PSK das proteínas serina/treonina quinases. Ela se autofosforila e, assim como a Yop H, interfere com a

transdução de sinais nas células do hospedeiro por alterar os níveis celulares de fosforilação (GALIOV et al., 1993; HAKANSSON et al., 1996; HARTLAND & ROBINS-BROWNE, 1998). Dentro da célula do hospedeiro interage com a actina, podendo causar mudanças e rompimento do citoesqueleto, o que pode prejudicar a fagocitose da *Yersinia* por macrófagos e, também, a movimentação desses para as áreas de infecção (JURIS et al., 2002).

A função da proteína YopM (41 kDa), mesmo que ainda permaneça pouco conhecida, tem se mostrado essencial para a virulência em modelos murinos de infecção (EVDOKIMOV et al., 2001; LEUNG et al., 1990). Recentemente, verificou-se que ela se liga e promove a atividade quinase da proteína quinase C2-like e da proteína quinase-1 ribossomal S6 (McDONALD et al., 2003), o que poderia explicar o seu efeito sobre a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e crescimento celular (SAUVONNET et al., 2002b), modulando a expressão gênica do hospedeiro em benefício do patógeno (SKRZYPEK et al., 2003).

A YopJ (32,5 kDa) é a Yop efetora que possui funções antiinflamatórias mais importantes, além de ser responsável pela indução de apoptose em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (MILLS et al., 1997; MONACK et al., 1997; MONACK et al., 1998). Estudos têm sugerido que a mesma pode ser capaz de inibir a produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-8 (SCHESSER et al., 1998; BOLAND e CORNELIS, 1998; PALMER et al., 1998) e que este fato resulta, provavelmente, do rompimento da ativação das vias de sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B (JURIS et al., 2002). A apoptose de macrófagos causada pela YopJ, também resulta, muito provavelmente, da inativação do NF- $\kappa$ B (PAGLIARI et al., 2000). A mesma pode funcionar como uma cisteína protease e que pode ser uma protease ubiquitina-like, a qual tem sido envolvida na modulação de várias vias de sinalização de células eucarióticas (YEH et al., 2000).

As proteínas codificadas pelos plasmídeos (pIB1, pYV e pCD1), ausentes nas cepas avirulentas, guiam a *Yersinia* patogênica através dos mecanismos de defesa do hospedeiro, permitindo que a mesma estabeleça seu nicho ecológico extracelularmente ou no interior de macrófagos (BOTTONE, 1997).

Vários autores já sugeriram que as três espécies patogênicas de *Yersinia* podem sobreviver e replicar dentro de fagossomos de macrófagos e modificar as suas funções bactericidas. Pujol e Bliska (2005) verificaram que a sobrevivência e replicação de *Yersinia* em macrófagos parecem ser de grande importância nos estágios iniciais de colonização. Evidências de que a bactéria pode subverter as funções dos macrófagos foram demonstradas através da inibição da acidificação do fagossomo em infecções com *Y. pseudotuberculosis*, e



através da inibição da produção de óxido nítrico em infecções com *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*.

Cepas virulentas de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são usualmente encontradas na forma de agregados bacterianos extracelulares, entre os abscessos, em tecidos linfóides de animais infectados por mais de 12 horas. Nos abscessos, a bactéria parece resistir eficientemente à fagocitose pelos neutrófilos (HANSKI et al., 1989; SIMONET et al., 1990) bem como induzir a apoptose de macrófagos (MONACK et al., 1997). Cepas curadas do plasmídeo de virulência são capazes de colonizar transitoriamente os linfonodos mesentéricos e os baços dos animais, entre uma a 48 horas após a infecção oral. Entretanto, isolados de *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são contidos em granulomas e são eliminados (ROBINS-BROWNE et al., 1985; LIAN et al., 1987).

Balada-Liasat e Meccas (2006) verificaram a importância do plasmídeo de virulência de *Y. pseudotuberculosis* na colonização de vários tecidos após inoculação intragástrica em camundongos. Utilizando quatro mutantes para o sistema de secreção do tipo III (TTSS) (*yscBL*, *yscNU*, *yscBU* e *pIB1*), inoculados em camundongos BALB/c, foram analisados os níveis de colonização e comparados ao da cepa isogênica selvagem, YpIII pIB1, a mesma utilizada neste trabalho. No 2º dia após a inoculação, os níveis de colonização das cepas mutantes no trato gastrointestinal, placas de Peyer e linfonodos cecais foram severamente atenuados. Nos linfonodos mesentéricos, os níveis de colonização foram similares entre as cepas mutantes e a selvagem, indicando que o TTSS não era necessário para a colonização desse órgão. No 5º dia, uma deficiente colonização das cepas mutantes foi evidenciada no trato gastrintestinal e baço, entretanto, nos linfonodos mesentéricos, placas de Peyer e linfonodos cecais foram similares ao da cepa selvagem e, em alguns casos, mais altos.

Barnes et al. (2006) demonstraram que as colonizações do baço e do fígado podem ocorrer antes da replicação nos tecidos linfóides intestinais, indicando que a infecção hepatoesplênica não requer, necessariamente, a disseminação prévia da bactéria para as PP e os MLN.

Experimentos com camundongos infectados com diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*, selvagem e mutantes com deleção no gene para produção de YopH e YopE, reafirmaram a capacidade do microrganismo de produzir infecção em sítios sistêmicos. Entretanto, os resultados mostraram que as cepas mutantes não foram capazes de colonizar o baço e fígado, ou seja, de promover infecção sistêmica, sugerindo a importância desses fatores de virulência na disseminação do patógeno e evasão da resposta imune do hospedeiro (LOGSDON e MECSAS, 2006).

Os mecanismos moduladores de *Yersinia* sobre a resposta imune inata e adaptativa ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma resposta imune celular eficiente, controlada por diferentes tipos celulares e suas respectivas citocinas, é necessária para superar a infecção por *Yersinia* (AUTENRIETH et al., 1992; AUTENRIETH et al., 1994; BOHN et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996; ZHAO et al., 2000).

O controle da infecção por *Yersinia* enteropatogênica inicia-se com a primeira linha de defesa do sistema imune, envolvendo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células NK (LIAN et al., 1987; AUTENRIETH et al., 1996; KERSCHEN et al., 2004). Subseqüentemente, uma importante resposta imune adaptativa é requerida para combater a infecção (VOGEL et al., 1993; IGWE et al., 1999), sendo que a sua resolução está associada à ativação de células Th1 (AUTENRIETH e HEESEMAN, 1992; AUTENRIETH et al., 1996).

Citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-12 (IL-12) parecem ser de grande importância durante a resposta imune contra *Yersinia*. A neutralização dessas citocinas foi capaz de eliminar a resistência a este patógeno, sugerindo que macrófagos ativados por células T são importantes células efetoras na resposta protetora à *Yersinia* (AUTENRIETH e HEESEMAN, 1992; BOHN et al., 1994; BOHN e AUTENRIETH, 1996).

Um balanço entre as citocinas Th1 e Th2 pode influenciar o curso da infecção por *Yersinia*, principalmente na fase inicial da resposta imune do hospedeiro (ZHAO et al., 2000).

As células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina-2 (IL-2), citocinas importantes na promoção da imunidade mediada por células e necessárias para uma resposta efetiva contra bactérias intracelulares. As células Th2 secretam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-13 (IL-13), citocinas responsáveis pela indução da resposta imune humoral, resultando na ativação de linfócitos B e conseqüente produção de anticorpos. As respostas Th1 são essenciais para a eliminação da bactéria, ao passo que as Th2 estão associadas com a suscetibilidade e disseminação da infecção (YIN et al., 1997; HERMANN-MÄRKER e HÖHLER, 1998).

A ativação mediada por receptor de antígeno na célula B e T pode sofrer interferência por *Yersinia pseudotuberculosis* e os efeitos inibitórios sobre os linfócitos são dependentes da produção de YopH. Quando as células T foram expostas transitoriamente à *Yersinia*, tornaram-se incapazes de influxionar cálcio e produzir citocinas. As células B primárias foram incapazes de regular positivamente a molécula co-estimuladora, B7.2, em resposta ao

estímulo antigênico. Esses resultados demonstraram que as respostas imunes mediadas por células T e B podem ser imensamente afetadas durante a infecção (YAO et al., 1999).

O modelo murino de yersiniose estabelecido por Carter e Collins (1975) é, ainda, o mais conveniente e mais amplamente usado para a investigação da interação da *Yersinia* com o hospedeiro, sob condições próximas àquelas ocorridas no homem.

Linfócitos T de diferentes linhagens de camundongos apresentam uma tendência a produzir diferentes perfis de citocinas Th1 e Th2 (HSIEH et al., 1995). Células TCD4<sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 expressam altos níveis de mRNA do IFN- $\gamma$  e níveis não-detectáveis de mRNA da IL-4, ao passo que células TCD4<sup>+</sup> de camundongos BALB/c expressam níveis elevados de mRNA da IL-4 e muito pouco mRNA do IFN-  $\gamma$  (HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991). A administração de IFN- $\gamma$ , IL-12 ou anticorpos anti-IL-4 tornam os camundongos BALB/c resistentes à *Yersinia*. Níveis elevados de IFN- $\gamma$ , predominantemente dependentes de IL-12, produzidos por células T CD4<sup>+</sup> e células NK de camundongos C57BL/6, correlacionam-se com resistência contra *Yersinia*, comparados com os camundongos BALB/c (BOHN e AUTENRIETH, 1996).

O IFN- $\gamma$  se apresenta como a principal citocina do perfil Th1, ao passo que a IL-4 se apresenta como a principal do perfil Th2, possuindo funções tanto indutoras como efetoras. O TNF- $\alpha$  atua em sinergismo com o IFN- $\gamma$  na ativação macrofágica (ROMAGNANI, 1994). As funções das citocinas Th2 na infecção por *Yersinia* precisam ser melhor investigadas (HEIN et al., 2000).

Algumas citocinas, especialmente a IL-10, podem regular negativamente a resposta inflamatória. Durante a yersiniose em camundongos BALB/c, a IL-10 parece agir antagonicamente à IL-12 (BOHN e AUTENRIETH, 1996). O antígeno V (LcrV) de *Y. pestis* estimula a produção de IL-10, inibindo, assim, o processo inflamatório (BRUBAKER, 2003).

Um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo, utilizando camundongos Swiss, sugeriu que as Yops secretadas por *Y. pseudotuberculosis*, principalmente a YopE e a YopH, possuem efeitos supressores sobre a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO pelos macrófagos (MONNAZZI et al., 2004).

As células dendríticas (DCs) constituem um grupo de células apresentadoras de antígeno (APCs) derivado de progenitores hematopoiéticos com capacidade para interagir com linfócitos T e B e modular as suas respostas (SOUZA et al., 1999; ARDAVIN et al., 2001; KELLER, 2001). Tanto elas como seus precursores apresentam plasticidade funcional. Ao mesmo tempo em que podem atuar como uma primeira barreira contra a invasão e expansão viral através da liberação de IFNs do tipo I e como importantes integrantes da

resposta imune inata, podem atuar, também, apresentando antígenos às células T e funcionando como um membro do sistema imune adaptativo (KADOWAKI et al., 2000; FONTENEAU et al., 2003). Estão presentes em órgãos não linfóides, incluindo o epitélio (epiderme e mucosa), a derme e o interstício de órgãos vascularizados. Também são encontradas no sangue, na linfa e em todos os órgãos linfóides (INABA et al., 1986; LOMBARDI et al., 1993; SOUZA et al., 1999; ARDAVIN et al., 2001; KELLER, 2001).

As células dendríticas humanas são leucócitos derivados de células progenitoras da medula óssea, originadas de 2 linhagens, mielóide e linfóide (BANCHEREAU et al., 2000; SHORTMAN e LIU, 2002). Células dendríticas derivadas de linhagens distintas diferem na sua distribuição tecidual, produção de citocinas e condições de crescimento (ADAMS et al., 2005).

A linhagem mielóide, caracterizada por expressar CD11c e pouco CD123, dá origem às DCs convencionais ou “mielóides”, compostas por: células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (SZABOLCS et al., 1996; GATTI et al., 2000). As moDCs podem ser encontradas em órgãos linfóides periféricos e na circulação sangüínea, onde produzem grandes quantidades de TNF- $\alpha$  em resposta a patógenos e outras causas de inflamação (ROSSI e YOUNG, 2005). As LCs e IDCs estão distribuídas em locais do organismo em que ocorre o primeiro encontro do antígeno com os mecanismos efetores do sistema imune. Assim, as LCs estão presentes na superfície epitelial da pele e mucosas, e as IDCs nos tecidos subepiteliais da derme e interstício de órgãos sólidos (ROSSI e YOUNG, 2005).

Células dendríticas “mielóides” são, ainda, subdivididas em sub-populações; porém, não foram claramente descritas as funções de cada sub-população (HEATH et al., 2004).

No baço murino duas principais sub-populações de células dendríticas podem ser encontradas, a CD11c<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> e a CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Nas PP são encontradas três sub-populações de DCs convencionais: a CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, a CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> e a CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> (Duplo Negativo). As DCs que expressam a molécula CD11b se localizam na região do dome subepitelial (SED) das PP. As que expressam a molécula CD8 $\alpha$  reside na região interfolicular (IFR), rica em células T. E a terceira sub-população, que não expressa CD11b nem CD8 $\alpha$ , sendo denominada DC duplo negativa (DN), é encontrada no SED, IFR e no epitélio associado ao folículo (FAE) (SATO e IWASAKI, 2005). As DN são encontradas em maiores porcentagens nos órgãos linfóides das mucosas, tais como as PP (29%) e os linfonodos mesentéricos (30%). No baço e linfonodos periféricos (13%) constituem uma população menor e indistinta (IWASAKI e KELSALL, 2001). A sub-

população de DCs CD11b<sup>+</sup> parece ser especializada no processamento de antígenos exógenos para apresentação em associação com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II). As DCs CD8α<sup>+</sup> são especializadas na captura de células mortas e exercem papel na resistência a certas infecções virais. Esta sub-população também tem sido associada ao mecanismo de apresentação cruzada, que é a capacidade de processar antígenos que não se replicam, para apresentação às células T através de moléculas de classe I (DUDZIAK et al., 2007).

A linhagem linfóide, por sua vez, é precursora das células dendríticas plasmocitóides, reconhecidas por serem CD11c<sup>-</sup> e possuírem elevada expressão de CD123 (GROUARD et al., 1997). Células dendríticas plasmocitóides são células importantes na imunidade inata antiviral e na autoimunidade. Encontradas no sangue e órgãos linfóides são células produtoras de IFNs α e podem estar associadas às respostas imunes anti-tumorais (ADAMS et al., 2005).

Células dendríticas utilizam diversos mecanismos para capturar os antígenos: fagocitose, endocitose, pinocitose e interação com receptores específicos. As proteínas dos antígenos são processadas em peptídeos e apresentadas na superfície celular ligadas às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II, onde serão reconhecidas por células T antígeno-específicas (ADAMS et al., 2005). Antígenos adquiridos no ambiente extracelular são tipicamente processados e apresentados associados às moléculas de MHC de classe II, ao passo que moléculas de MHC de classe I associam-se a antígenos presentes no compartimento citosólico (GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003; ACKERMAN et al., 2005).

Quando expostas aos produtos microbianos, as DCs sofrem maturação e migram para órgãos linfóides secundários, locais de ativação de células T (NIESS e REINECKER, 2006). O processo de maturação estimula numerosas propriedades imunogênicas das DCs, tais como expressão de moléculas co-estimuladoras, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (SCANDELLA et al., 2002; MAILLIARD et al., 2004), que maximizam sua habilidade em induzir a ativação e proliferação de linfócitos T (GRANUCCI et al., 2005). Em contraste, na ausência de inflamação, as DCs mantêm-se no estágio imaturo, não sendo capazes de ativar efetivamente as células T, e promovendo a proliferação abortiva ou anergia dos linfócitos T, mecanismo responsável pela estabilidade da tolerância periférica (STEINMAN et al., 2003).

Os produtos microbianos constituem uma forma fisiológica de ativação das DCs mielóides e plasmocitóides (JARROSSAY et al., 2001; KADOWAKI et al., 2001). As DCs expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que interagem com padrões moleculares associados aos patógenos, expressos por produtos microbianos e moléculas do

tecido hospedeiro lesado (ROSSI e YOUNG, 2005). Dentre esses receptores de reconhecimento estão os denominados “*Toll-like Receptors*” (TLR) (QI et al., 2003).

Em humanos e camundongos, as distintas subpopulações de DCs expressam diferentes TLRs. As DCs plasmocitóides expressam exclusivamente TLR-7 e TLR-9 (KRUG et al., 2001), ao passo que as mielóides expressam TLR-1-6 e TLR-8 (LIU, 2005). A interação com diferentes ligantes de TLRs estimula a maturação das DCs e induz a secreção de citocinas, modulando o balanço Th1/Th2 de acordo com as interações microbianas (REIS e SOUSA et al., 1999; MOSER e MURPHY, 2000).

Outro grupo de receptores de reconhecimento de padrões expressos por células dendríticas é constituído pelos receptores de lectina tipo C, os quais interagem com carboidratos de glicoproteínas de antígenos próprios e com alguns patógenos que exploram essa interação para evadir da ativação imune. Células dendríticas residentes ou não ativadas expressam estes receptores, ao passo que células dendríticas ativadas e maduras têm baixa expressão de receptores de lectina tipo C (EBNER et al., 2004).

Desse modo, TLRs e receptores de lectina tipo C trabalham para balancear tolerância imunológica e ativação celular (HAWIGER et al., 2001; LIU et al., 2002).

Após a ativação da resposta imune celular e/ou humoral, T-dependente ou independente, a população de células dendríticas sofre uma redução significativa em sua quantidade, desencadeada, provavelmente, por apoptose (HART, 1997; McLELLAN e KÄMPGEN, 2000; KELLER, 2001).

Estudos prévios demonstraram que *Y. enterocolitica* também pode ter as DCs como alvo (SCHOPPET et al., 2000). Estes autores demonstraram que embora infecção *in vitro* de DCs humanas com *Y. enterocolitica* não resulte na morte das DCs, uma regulação negativa transitória das moléculas de classe II do MHC e de moléculas CD80 foi observada e acompanhada por uma capacidade diminuída de ativação de célula T.

Erfuth et al. (2004), utilizando um modelo de infecção *in vitro*, demonstraram que *Y. enterocolitica* pode afetar várias funções importantes de DCs de camundongos, incluindo maturação e a produção de citocinas. Foi demonstrado que YopP de *Y. enterocolitica* também induz morte celular de DCs murinas, incluindo mecanismos dependentes e independentes de caspase (ERFUTH et al., 2004; GRÖBNER et al., 2006). YopP previne a sensibilização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> muito provavelmente atuando sobre as DCs (ERFUTH et al., 2004; TRÜLZSCH et al., 2005).

Kramer e Wiedig (2005) verificaram que *Y. enterocolitica* diminui o processamento de antígenos pelas células dendríticas e que este efeito é provocado, principalmente, pela YopP.

Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos através dos quais as DCs atuam sobre os linfócitos T na yersiniose. Também é necessário investigar se as mudanças nas DCs induzidas por *Yersinia* também são observadas *in vivo*, isto é, após a infecção de camundongos com amostras patogênicas de *Yersinia*. Além disso, a maioria dos trabalhos realizados utilizou células dendríticas derivadas de medula óssea. Estas células podem não exibir as mesmas características funcionais e grau de maturação das células derivadas de baço ou das placas de Peyer.

Diante do conhecimento de que tanto os tipos de DCs quanto os sinais de ativação a que as mesmas são expostas são importantes para o direcionamento do padrão de resposta Th1 ou Th2, o presente trabalho objetivou verificar a importância das DCs na determinação do padrão de resposta imune durante a infecção por via intragástrica de camundongos susceptíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) com *Y. pseudotuberculosis* e seu par isogênico, curado do plasmídeo de virulência.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Investigar o papel das células dendríticas das placas de Peyer na determinação do padrão de resposta imune, Th1 e Th2, durante a infecção por via intragástrica de camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) com *Yersinia pseudotuberculosis* ou seu par isogênico, curado do plasmídeo de virulência;

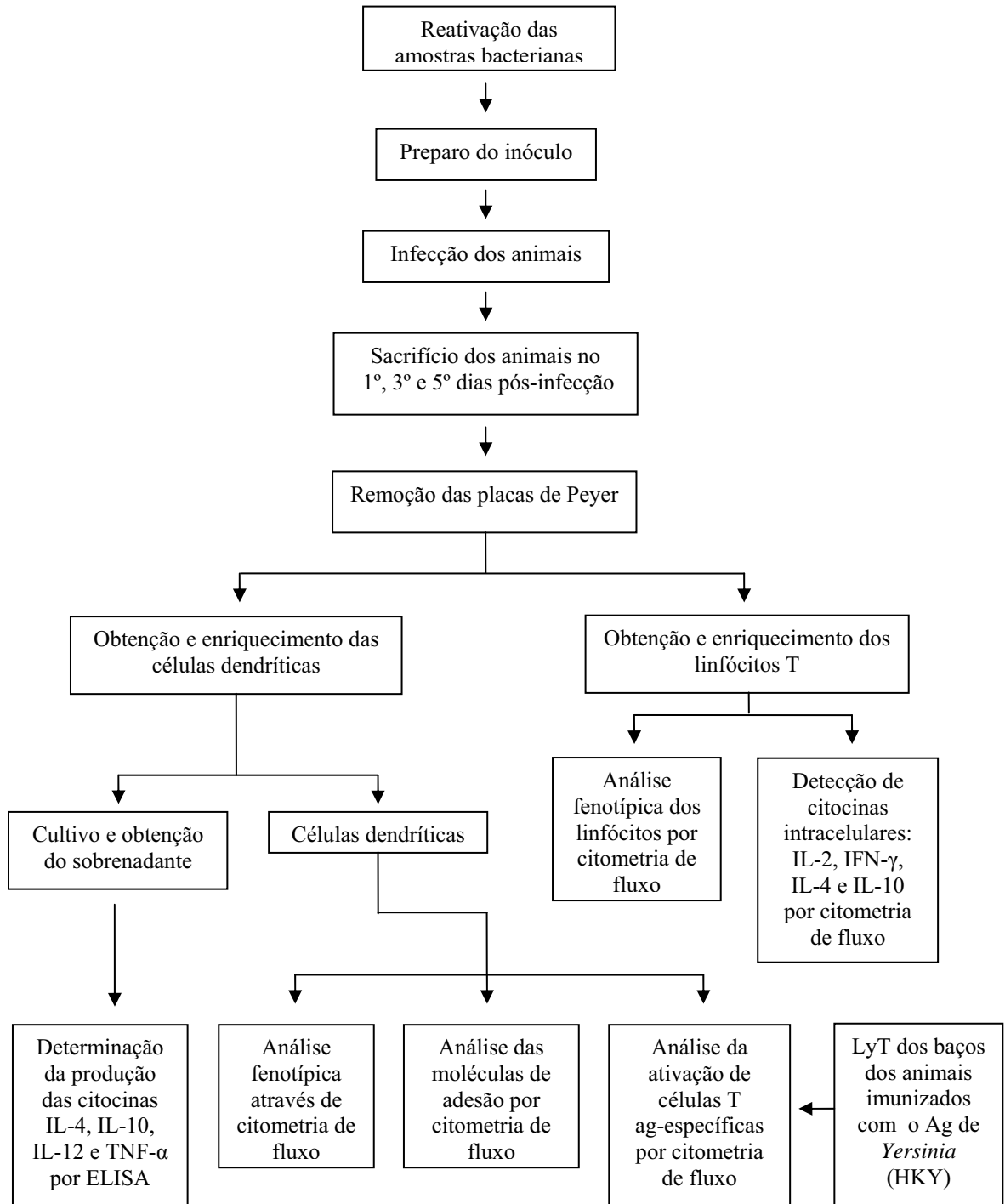
### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão de moléculas de superfície nas células dendríticas que contribuem para a formação da sinapse imunológica (MHC classe II, CD80, CD86 e ICAM-1);
- Analisar a secreção de citocinas pelas células dendríticas (IL-4, IL-10, IL-12 e TNF-alfa);
- Verificar a influência das células dendríticas dos animais infectados sobre a proliferação de linfócitos T e o padrão de citocinas Th1/Th2 secretadas pelos mesmos.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Fluxograma de trabalho



### 3.2. Animais

No presente estudo foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c, SPF (“Specific Pathogen Free”), com idades entre 6 e 8 semanas, adquiridas do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram transportados em mini-isoladores, alojados no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Campus de Araraquara, e mantidos em isoladores para garantir sua condição SPF, com acesso à ração e água esterilizadas “ad libitum”.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, sob o parecer nº 07/2006. A cópia do referido parecer encontra-se anexa (Anexo 1).

### 3.3. Amostras Bacterianas

Foram utilizadas as seguintes amostras bacterianas: *Yersinia pseudotuberculosis* YpIII pIB1 (amostra portadora de plasmídeo de virulência – Yp<sup>+</sup>) e YpIII (amostra curada de plasmídeo de virulência – Yp<sup>-</sup>). Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Hans Wolf-Watz do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Umea, Suécia.

### 3.4. Infecção experimental dos animais com as amostras de *Y. pseudotuberculosis*

#### 3.4.1. Reativação das amostras

Previamente à padronização do inóculo, as amostras bacterianas foram reativadas mediante a passagem em camundongos. Para tal, uma alçada da amostra em estoque foi semeada em meio TSB (“Tryptic Soy Broth”), incubada a 25°C por 24 horas e, a seguir, plaqueada em meio BAB (“Blood Agar Base”). Depois foi incubada novamente a 25°C, durante 48 horas, para a obtenção do crescimento bacteriano.

Para cada amostra a ser reativada foram utilizados dois animais inoculados por via intravenosa com 0,2 mL da suspensão bacteriana, contendo um valor estimado de 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Essa suspensão foi preparada a partir de uma suspensão inicial contendo 10<sup>10</sup> UFC/mL, padronizada em escala 3 de Mac Farland e apresentando densidade ótica igual a 0,36 em 550 nm (Du<sup>R</sup> 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer – Beckman). Decorrido um período de 24 horas, os animais foram sacrificados, seus baços retirados, macerados em 1 mL de solução estéril de NaCl 0,85%,

semeados em meio de cultura BAB e incubados a 25°C durante 48 horas. A partir deste crescimento foi preparado o inóculo para os experimentos.

### **3.4.2. Preparo do inóculo**

O crescimento das amostras após o plaqueamento dos baços dos animais foi retirado e diluído em solução esterilizada de NaCl 0,85%, de maneira a obter-se uma suspensão contendo cerca de  $10^{10}$  UFC/mL, padronizada em espectrofotômetro a 550 nm e densidade óptica de 0,36. A partir dessa suspensão inicial, uma suspensão foi preparada para a realização da inoculação ( $10^8$  UFC/mL). Outra, de  $10^4$  (diluição  $10^{-6}$ ), foi utilizada para semeadura em meio BAB e confirmação da dose utilizada no inóculo.

### **3.4.3. Esquema de infecção**

Lotes de 6 ou 12 animais foram infectados, dependendo do experimento, com as diferentes amostras de *Yersina pseudotuberculosis*, mantendo-se sempre um lote com o mesmo número de animais não infectados como controle. A inoculação foi realizada por via intragástrica utilizando-se agulha de gavagem e um volume de 0,25 mL da suspensão bacteriana contendo  $10^8$  UFC/mL. Grupos de animais infectados e controles foram sacrificados e suas placas de Peyer retiradas no 1º, 3º e 5º dias após a infecção (pi).

## **3.5. Obtenção e análise das células dendríticas**

### **3.5.1. Obtenção e enriquecimento (Kadaoui e Corthésy, 2004)**

Células dendríticas (DCs) foram obtidas das placas de Peyer de 6 ou 12 animais infectados e controles. Após o sacrifício dos camundongos em câmara de CO<sub>2</sub>, as placas foram removidas e incubadas por 30 minutos em 3 mL de RPMI-1640 suplementado com L-glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100ug/mL), 2-mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-2}$  M), 5 % de soro fetal bovino (SFB), 0,5 mg/mL de colagenase (tipo IA – Sigma) e 15 ug/mL de DNase (Sigma). A seguir, foram maceradas para a liberação das células. Suspensões celulares constituídas de 4 “pools” de 3 animais (2 “pools” de 3 animais para a determinação da ativação de células T Ag-específicas) foram filtradas em peneira de nylon com poros de 40 µm (Falcon, BD Biosciences) e recuperadas por centrifugação a 400 g, a 4°C, durante 10 minutos. Logo após, foram lavadas 2 vezes com 5 mL de tampão A [Tampão salina-fosfato (PBS) pH 7.3, 5% de soro fetal bovino e ácido etilenodiamino tetra-acético 5mM (EDTA) (pH 8.0)], através de centrifugação a 400 g durante 10 minutos, e

ressuspendidas no mesmo tampão em concentração que não excedesse  $10^8$  céls/mL. As células foram, então, incubadas com anticorpos de rato anti-CD16/CD32 de camundongo (*Mouse FcBlock*, 1/100, BD PharMingen) por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , lavadas e ressuspendidas em tampão A. Em seguida, procedeu-se a purificação das células dendríticas utilizando esferas magnéticas cobertas com anti-CD11c de camundongo (MicroBeads CD11c - Miltenyi Biotec), conforme as instruções do fabricante, e as células recuperadas por centrifugação foram ressuspendidas em RPMI suplementado e analisadas quanto à viabilidade celular através da técnica de exclusão do Azul Trypan (MISHELL e SHIIGI, 1980). Esse procedimento foi realizado para a obtenção das células dendríticas utilizadas em quatro experimentos: análise fenotípica, determinação da expressão de moléculas de adesão, análise da ativação de células T ag-específicas e determinação da produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ .

### **3.5.2. Análise fenotípica através de citometria de fluxo (Pulendram et al., 2001)**

Após a purificação,  $5 \times 10^3$ - $3 \times 10^4$  células dendríticas suspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão B gelado [PBS contendo 0,5% de soro albumina bovina (BSA), 5 mM EDTA (pH 8,0)] foram marcadas por 30 minutos, a  $4^\circ\text{C}$  e ao abrigo da luz com os anticorpos monoclonais anti-CD11c conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD11b conjugado à ficoeritrina (PE) e anti-CD8 $\alpha$  conjugado à ficoeritrina Cy7 (PE-Cy7) (BD PharMingen) para determinação das sub-populações. Após duas lavagens com 500  $\mu\text{L}$  de PBS contendo 1% de BSA, a 358 g, a  $4^\circ\text{C}$  e durante 5 minutos, as células foram ressuspendidas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS contendo 1% de formol e mantidas ao abrigo da luz até o momento da leitura. As DCs foram especificamente analisadas por “gating” seletivo baseado nos parâmetros de tamanho e granulosidade celulares. Imunoglobulinas isotipo-específicas marcadas com os mesmos fluorocromos (BD PharMingen), que não se ligam às células dendríticas murinas, foram utilizadas como controles. Todas as amostras foram analisadas através de citometria de fluxo em Citômetro BD FACS-Canto (BD Biosciences) com o auxílio do software FACSDiva.

### **3.5.3. Análise das moléculas de superfície através de citometria de fluxo**

Para avaliar a expressão das moléculas de superfície nas células dendríticas dos animais infectados e controles, utilizou-se o mesmo procedimento para a análise fenotípica, diferenciando apenas quanto aos anticorpos monoclonais utilizados. Suspensões de células dendríticas foram marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD11c-FITC e individualmente com anticorpos monoclonais anti-I-A/I-E-PE, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE e anti-CD54-PE

(BD PharMingen). Também foram utilizadas como controles imunoglobulinas isotipo-específicas marcadas com os mesmos fluorocromos (BD PharMingen).

#### **3.5.4. Determinação da produção de citocinas por ELISA.**

Para o estudo dos efeitos da infecção de camundongos com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* sobre a secreção de citocinas pelas células dendríticas, as mesmas foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100ug/mL) e 10% de SFB, e mantidas por 48 h a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Uma fração foi cultivada na presença de 1ug/mL de lipopolissacarídeo (LPS de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, Sigma), como controle positivo, e outras na presença de 10 µg/mL de HKY (suspensões de *Y. pseudotuberculosis*, YpIII e YpIII pIB1, mortas pelo calor) ou apenas de RPMI-1640 suplementado. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 18000 g e armazenados a -80°C para posterior determinação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF-α secretadas, utilizando kits comerciais (OptEIA™ ELISA set, BD PharMingen).

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram adsorvidas com 100 µL dos anticorpos de captura das respectivas citocinas pesquisadas, diluídos em Tampão Fosfato 0,2M (pH 6,5) ou Tampão Carbonato 0,1M (pH 9,5) (“Coating Buffer”), e incubadas “overnight” à 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com 300 µL de PBS contendo 0,05% Tween-20 e bloqueadas com 200 µL de PBS contendo 10% de SFB (pH 7,0), à temperatura ambiente por 1 hora, e novamente lavadas 3 vezes. Adicionou-se 100 µL de cada citocina padrão ou do sobrenadante testado, e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido esse período, as placas foram lavadas 5 vezes e, em seguida, foram adicionados 100 µL do Detector de Trabalho (Anticorpo de Detecção + Reagente Enzimático) em cada cavidade. As mesmas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e, posteriormente, lavadas 7 vezes. Foram, então, adicionados 100 µL do substrato TMB (Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio - OptEIA™, BD PharMingen) em cada cavidade e realizou-se uma incubação de 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (“Stop Solution”).

As absorbâncias foram obtidas a 450 nm em leitor de ELISA (Microplate Reader - Model 550 – BIO-RAD) e as concentrações das citocinas foram determinadas utilizando-se curvas padrões previamente estabelecidas com concentrações conhecidas.

### **3.5.5. Determinação da ativação de células T Ag-específicas**

#### **3.5.5.1. Preparo do Antígeno de *Yersinia* – HKY (“Heat-killed *Yersinia*”)**

As amostras bacterianas foram cultivadas como descrito anteriormente, mortas pelo calor através de incubação em banho-maria a 60°C por 1 hora, coletadas por centrifugação (Centrífuga Beckman Avanti™ 30), lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e ressuspensas no mesmo. Esta suspensão bacteriana foi congelada e, posteriormente, liofilizada para que, na forma de pó, fosse possível a sua utilização na concentração adequada, 10 µg de liofilizado/mL.

#### **3.5.5.2. Imunização de camundongos com HKY para a obtenção dos linfócitos T antígeno-específicos**

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados por via intraperitoneal com 10 µg de HKY misturados com 1 mg de hidróxido de alumínio em solução salina 0,15 M. Decorridos 14 dias, os camundongos receberam uma segunda dose de 10 µg do antígeno em solução salina. A partir de 7 dias após a 2ª inoculação, os linfócitos T dos baços dos animais foram isolados e utilizados no co-cultivo com células dendríticas.

#### **3.5.5.3. Obtenção e enriquecimento dos linfócitos T**

Linfócitos T foram purificados dos baços dos animais imunizados com HKY, em condições assépticas, através de maceração em PBS gelado (pH 7,2), seguida de 2 lavagens a 200 g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 5 mL de cloreto de amônio 0,83% e 1 mL de SFB e deixadas em repouso por 5 minutos, a fim de se promover a lise das hemácias. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em RPMI-1640 suplementado com 1 µL/mL de L-glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100ug/mL) e 10% de SFB para se efetuar a terceira lavagem. As células T foram purificadas utilizando-se um sistema de marcação indireta magnética (*Pan T Cell Isolation Kit*, Miltenyi Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, as células foram ressuspensas em 5 mL de RPMI-1640 suplementado, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de RPMI, igualmente suplementado, e procedeu-se a contagem do número dos linfócitos viáveis através de coloração com Azul Trypan. Os linfócitos T antígeno-específicos serviram como sensores para a eficácia da apresentação de antígenos pelas células dendríticas.

#### 3.5.5.4. Ensaio de proliferação de células T

A capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas das placas de Peyer dos animais infectados e controles foi analisada através de co-cultura com linfócitos T e determinação da proliferação das células T por citometria de fluxo usando o CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester). O CFSE acopla espontânea e irreversivelmente em proteínas de superfícies celulares e intracelulares, através de reação com cadeias laterais de lisina e de outros grupos amina disponíveis. Quando as células se dividem, a marcação de CFSE é igualmente distribuída entre as células filhas, que apresentam, todavia, metade da fluorescência das células mãe. O número de divisões, que pode ser seguido, só é limitado pelo nível de auto fluorescência de células não marcadas e pela uniformidade no tamanho da população das células marcadas (HODGKINS et al., 1996).

Células T dos baços dos animais imunizados com HKY foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS 0,5% BSA (máximo de  $0,5-1,0 \times 10^7$  células/mL) e, em seguida, marcadas com  $2,5 \mu\text{M}$  de CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl Ester, Sigma) por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro. Imediatamente após os 10 minutos, a marcação foi interrompida pela adição de 5 volumes de RPMI 10% de SFB gelado e incubação por 5 minutos em gelo, no escuro. As células foram lavadas 3 vezes com 20 mL de RPMI 10% de SFB gelado e ressuspendidas na concentração de  $4 \times 10^5$  linfócitos T/mL.

As células dendríticas provenientes dos camundongos infectados e controles foram pré-incubadas com  $10 \mu\text{g/mL}$  de antígeno de *Yersinia* (HKY), a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas. Células T marcadas com CFSE foram colocadas em placas de 24 orifícios (Corning), na densidade de  $4 \times 10^5$  células/cavidade, e co-cultivadas com  $10^5$  células dendríticas/cavidade. Suspensões de  $4 \times 10^5$  linfócitos T não marcados e  $4 \times 10^5$  linfócitos T marcados com CFSE, ambos não estimulados ou não co-cultivados com células dendríticas, também foram acrescentados à placa e foram, posteriormente, utilizados como controles. A placa foi embrulhada em papel alumínio e incubada por 4 dias a  $37^\circ\text{C}$ , em 5% de  $\text{CO}_2$ . Decorrido o período de incubação, as células em cultura foram homogeneizadas e coletadas em tubos cônicos de 15 mL protegidos da incidência da luz. A seguir, foram lavadas 3 vezes com 2 mL de PBS 0,5% de BSA, a  $4^\circ\text{C}$ , por 5 minutos a 358 g e ressuspendidas em PBS 0,5% de BSA numa concentração de  $4 \times 10^5$  céls/mL. Aliquotas de  $500 \mu\text{L}$  das suspensões celulares foram distribuídas em tubos de citometria. Os tubos contendo linfócitos T marcados com CFSE e não estimulados e linfócitos T marcados com CFSE e estimulados (co-cultivados com células dendríticas) foram incubados com concentrações saturantes de anticorpo monoclonal anti-CD3-PE-Cy5 e anti-CD4-PE (BD PharMingen), no escuro, por 30 minutos e a  $4^\circ\text{C}$ . Ao término desta incubação,

as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 0,5% de BSA (358 g/ 5 minutos) e ressuspendidas em PBS contendo 1% de formol, para fixação, e foram estocadas no escuro a 4°C até o momento da análise. A análise da intensidade de fluorescência do CFSE dos linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foi analisada por citometria de fluxo em Citômetro FACSCanto (Becton Dickinson), com excitação a 488 nm e canal de detecção FL1. A determinação da proliferação das células T foi analisada através da razão da mediana de intensidade de fluorescência obtida para os linfócitos marcados com CFSE e não estimulados (células que não proliferaram e que apresentam intensidade de fluorescência máxima) pela mediana de intensidade de fluorescência obtida para os linfócitos marcados com CFSE e estimulados ou co-cultivados com células dendríticas (células que proliferaram e que reduziram a intensidade de fluorescência do CFSE).

### **3.6. Quantificação das sub-populações de linfócitos T e determinação do padrão de citocinas Th1 e Th2 através de citometria de fluxo (Morita et al., 1998)**

#### **3.6.1. Obtenção das células das placas de Peyer**

Os camundongos dos grupos controles e infectados foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, as placas de Peyer retiradas em condições assépticas e maceradas em 3 mL de RPMI suplementado com L-glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100ug/mL), 2-mercaptoetanol (5x10<sup>-2</sup> M) e 5 % de SFB. A suspensão celular foi filtrada em peneira de nylon com poros de 70 µm (Falcon, BD Biosciences), transferida para tubos cônicos de polietileno e recuperada por centrifugação (Centrífuga Fanem Excelsa II 206MP) a 358 g, a 4°C, durante 5 minutos. Após a centrifugação, as células foram lavadas com 5 mL de RPMI-1640 suplementado por mais duas vezes e ressuspendidas em 1 mL de RPMI, igualmente suplementado, para contagem do número de linfócitos viáveis, através de coloração com Azul Trypan. Uma fração dos linfócitos foi examinada quanto às suas características fenotípicas através de coloração com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular e outra foi avaliada quanto à produção de citocinas Th1/Th2, através da determinação de citocinas intracelulares presentes nos linfócitos.

#### **3.6.2. Análise fenotípica dos linfócitos das placas de Peyer**

Uma fração dos linfócitos foi centrifugada e ressuspendida em 2 mL de PBS contendo 1% de BSA. A seguir, as células foram bloqueadas com uma solução de *Mouse FcBlock* (BD PharMingen) e incubadas por 20 minutos a 4°C. Após sua distribuição em tubos de



citometria, as mesmas foram incubadas com concentrações saturantes de anticorpo monoclonal anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE e anti-CD8 conjugado ao “spectral red” (SPRD) (todos da marca Southern Biotech), no escuro, por 30 minutos e a 4°C. Ao término desta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA (358 g/ 5 minutos) e ressuspensas em PBS contendo 1% de formol, para fixação, e estocadas no escuro a 4°C até o momento da análise. A análise da expressão dos marcadores de superfície foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto (Becton Dickinson). Os linfócitos foram especificamente analisados por “gating” seletivo baseado nos parâmetros de tamanho e granulosidade celulares. Imunoglobulinas isotipo-específicas marcadas com os mesmos fluorocromos, que não se ligam aos linfócitos murinos, foram utilizadas como controles.

### **3.6.3. Detecção das citocinas intracelulares IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10**

O restante da suspensão de linfócitos ( $10^5$  células/mL), destinado à detecção intracitoplasmática das citocinas, foi distribuído em uma placa de 24 cavidades. Parte destas células foi estimulada com 25 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) (Sigma) e 1  $\mu$ g/mL de ionomicina (Sigma), e a outra parte não recebeu estímulo. As células foram incubadas por 2 horas, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu$ g/mL de brefeldina A (Sigma) em todas as cavidades e a placa foi incubada nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO<sub>2</sub>, por mais 4 horas. A brefeldina A foi utilizada para melhorar a análise das citocinas intracelulares, devido ao seu efeito inibitório na secreção de proteínas, o que permite um acúmulo das citocinas no complexo de Golgi, produzindo um aumento do sinal que poderá ser detectado pelo citômetro de fluxo. Ao final do período, as suspensões de células, tanto estimuladas “in vitro” quanto não estimuladas, foram transferidas das cavidades da placa para respectivos tubos cônicos e centrifugadas a 358 g por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas e ressuspensas igualmente em PBS 1% de BSA (358 g / 5 minutos). Logo após, adicionou-se a solução *Mouse FcBlock*<sup>TM</sup> (BD PharMingen) e as células foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Terminada esta incubação, iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3 e CD8. Para isto, foram adicionados os anticorpos anti-CD3-FITC e anti-CD8-SPRD e realizou-se uma incubação por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Na seqüência, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1% BSA (358 g / 5 minutos) e ressuspensas em solução *CytoFix /CytoPerm* (BD PharMingen) a fim de proporcionar a fixação e permeabilização das mesmas. Após incubação de 20 minutos a 4°C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas com o tampão *Perm Wash* (BD PharMingen), distribuídas nos

respectivos tubos de citometria, lavadas novamente e ressuspendidas em 50 $\mu$ L de *Perm Wash*. Os anticorpos monoclonais citocina-específicos anti-IL-2, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-4 e anti-IL-10 e anticorpos monoclonais isotipo-controles, todos conjugados com PE (Southern Biotech), foram adicionados aos seus respectivos tubos de citometria. Seguiu-se nova incubação a 4°C e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. As suspensões foram lavadas duas vezes com *Perm Wash*, foram adicionados 500  $\mu$ L de PBS 1% de formol e os tubos foram acondicionados a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo. A análise dos dados foi feita no citômetro FACSCanto usando o programa FACSDiva (BD). As citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram analisadas indiretamente através da separação e análise da população de linfócitos CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, visto que a estimulação com forbol ésteres diminui a expressão de CD4 (SOLBACH, 1982).

### 3.7. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi realizada, inicialmente, uma análise de ponto influente via intervalo interquartilico para eliminar os valores que se encontravam fora desse intervalo e que poderiam prejudicar a aproximação para a distribuição normal e, por consequência, interferir na aplicação da técnica de análise.

Na análise realizada para a fenotipagem das subpopulações de linfócitos T das placas de Peyer constatou-se uma aproximação suficientemente boa com a distribuição normal, o que garantiu a aplicabilidade de testes paramétricos nos dados experimentais. Assim, foi utilizado o teste F, via análise de variância univariada de fator único (Anova One-Way), com um teste t para as comparações post-hoc.

Para o experimento de detecção de citocinas intracelulares dos linfócitos foi realizada uma análise não-paramétrica devido às análises terem sido apresentadas por medianas. As comparações foram feitas com base no teste para amostras independentes de Mann-Whitney.

Análises descritivas foram utilizadas para os experimentos que envolveram as células dendríticas (Imunofenotipagem, Análise das moléculas de adesão, Análise da ativação de células T ag-específicas e Determinação da produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ). O número reduzido de células dendríticas obtido das placas de Peyer não forneceu números de dados suficientes para a realização de análise estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise fenotípica das células dendríticas

As células dendríticas ( $CD11c^+$ ) e subpopulações  $CD11c^+C11b^+$  e  $CD11c^+CD8\alpha^+$  das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 foram quantificadas no 1º, 3º e 5º dias após a infecção com as amostras YpIII pIB1( $Yp^+$ ) e YpIII ( $Yp^-$ ). As mesmas populações de dendríticas provenientes de animais não infectados foram quantificadas e os valores obtidos serviram como controles.

Devido ao número reduzido de células dendríticas nas placas de Peyer utilizou-se um “pool” de células obtido das placas de Peyer de 12 animais para cada grupo e dia estudado. A Tabela 1 e Figura 1 apresentam o número encontrado de células dendríticas e suas subpopulações em 30.000 eventos analisados por citometria de fluxo.

Quanto ao número de células dendríticas ( $CD11c^+$ ) encontrado, os animais controles da linhagem C57BL/6 apresentaram um número 3,5 vezes maior de células em relação aos animais controles BALB/c (Tabela 1).

Em relação às subpopulações de células dendríticas, camundongos BALB/c controles apresentaram um número 4,8 vezes maior da sub-população  $CD11c^+CD8-\alpha^+$  em relação à  $CD11c^+CD11b^+$ ; e camundongos C57BL/6 controles apresentaram um número 1,2 vezes maior da sub-população  $CD11c^+CD11b^+$  em relação à sub-população  $CD11c^+CD8-\alpha^+$  (Tabela 1).

Comparando os camundongos BALB/c infectados com a amostra  $Yp^+$  com o seu grupo controle foi possível verificar que apresentaram uma redução no número de células dendríticas no 1º dia pós-infecção, aumentando esse número gradativamente a partir do 3º dia, e tendo o seu maior aumento no 5º dia pós-infecção (1,7 vezes maior). Já o grupo infectado com a amostra  $Yp^-$  apresentou um aumento durante todo o período analisado, principalmente a partir do 3º dia em que observou-se o seu maior aumento (2,0 vezes maior) (Figuras 1A, 2A e 2B).

Os dois grupos infectados da linhagem C57BL/6 apresentaram redução no número de células dendríticas em todo o período da infecção, principalmente no 1º e no 5º dia, sendo observadas as maiores reduções durante o 5º dia (2,5 vezes menor para  $Yp^+$  e 4 vezes menor para  $Yp^-$ ) (Figuras 1A, 2C e 2D).

Relativamente à quantificação da sub-população  $CD11c^+C11b^+$  observou-se que os animais controles da linhagem C57BL/6 apresentaram um número maior desse subtipo

quando comparados aos animais da linhagem BALB/c (48,1 vezes maior) (Tabela 1 e Figura 1B).

Aumentos da sub-população  $CD11c^+C11b^+$  foram observados nos dois grupos de animais BALB/c. Para o grupo infectado com a amostra  $Yp^+$  esse aumento ocorreu em todo o período analisado, com o maior aumento no 5º dia pós-infecção (13,6 vezes). Para o grupo infectado com a amostra  $Yp^-$  verificou-se um discreto aumento no 1º e no 5º dia, e o maior aumento no 3º dia (3,5 vezes maior) (Figuras 1B, 2E e 2F).

A mesma sub-população teve seus números reduzidos nos animais C57BL/6 durante todo o período. Para a amostra  $Yp^+$  uma maior redução foi observada no 5º dia, e para a amostra  $Yp^-$  ocorreu uma intensa redução, observada principalmente no 1º dia (67,3 vezes menor) (Figuras 1B, 2G e 2H).

Animais controles C57BL/6 apresentaram um número maior de células dendríticas da sub-população  $CD11c^+CD8\alpha^+$  quando comparados aos animais controles BALB/c (8,5 vezes maior) (Tabela 1).

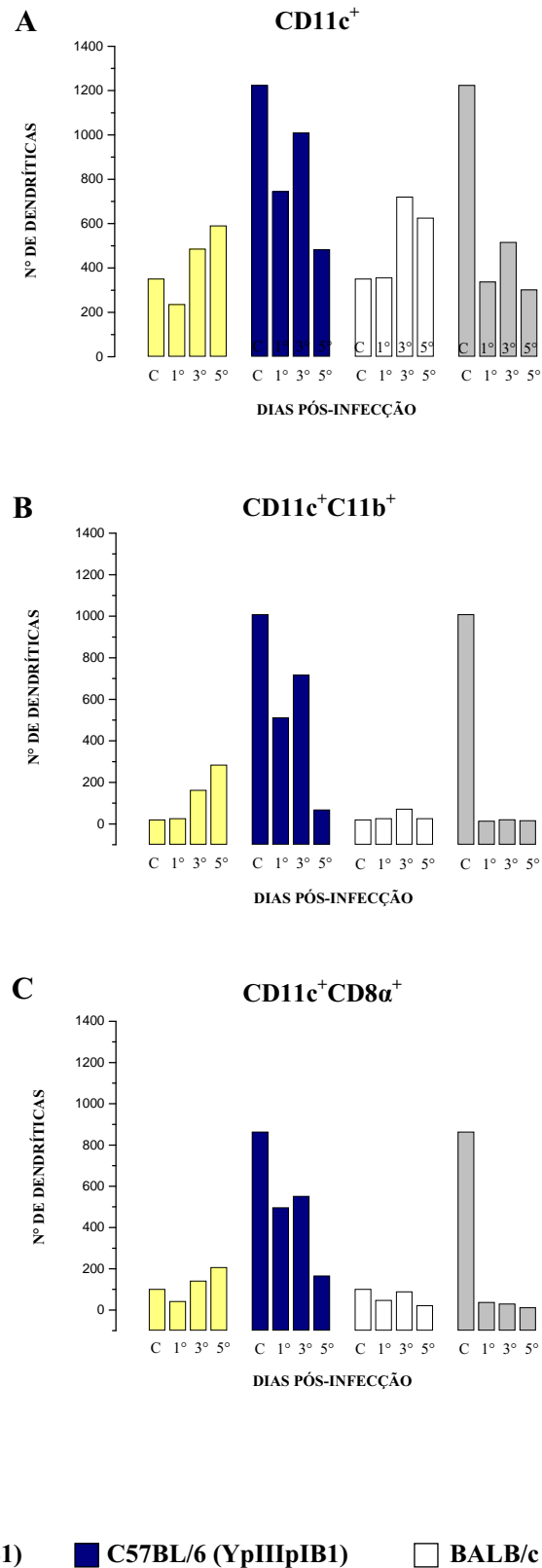
Uma redução dessa sub-população foi observada durante todo o período analisado nos dois grupos da linhagem C57BL/6, com a maior redução no 5º dia para as duas amostras e uma redução mais intensa para a amostra não portadora de plasmídeo ( $Yp^+$ , 5,2 vezes menor e  $Yp^-$ , 66,5 vezes menor) (Figuras 1C, 2K e 2L).

Os dois grupos da linhagem BALB/c apresentaram comportamentos diferentes em relação a essa sub-população de célula dendrítica. O grupo infectado com  $Yp^+$  apresentou redução dessa sub-população no 1º dia, mas aumentou a partir do 3º e atingiu o seu pico no 5º dia (aumento de 2,0 vezes em relação ao grupo controle). O grupo infectado com  $Yp^-$  apresentou uma redução em todo o período, com uma maior redução observada no 5º dia (4,4 vezes menor) (Figuras 1C, 2I e 2J).

De um modo geral, a infecção por *Y. pseudotuberculosis* com a amostra portadora de plasmídeo de virulência provocou um aumento no número de células dendríticas ( $CD11c^+$ ) e suas populações  $CD11c^+C11b^+$  e  $CD11c^+CD8\alpha^+$  nos animais BALB/c, e uma redução no número de dendríticas e suas subpopulações nos animais C57BL/6. A infecção com a amostra não portadora de plasmídeo de virulência provocou um aumento no número de células dendríticas e no número da sub-população  $CD11c^+C11b^+$ , bem como uma redução no número da sub-população  $CD11c^+CD8\alpha^+$  nos animais BALB/c. Nos animais C57BL/6 provocou uma redução no número de dendríticas e no número das subpopulações.

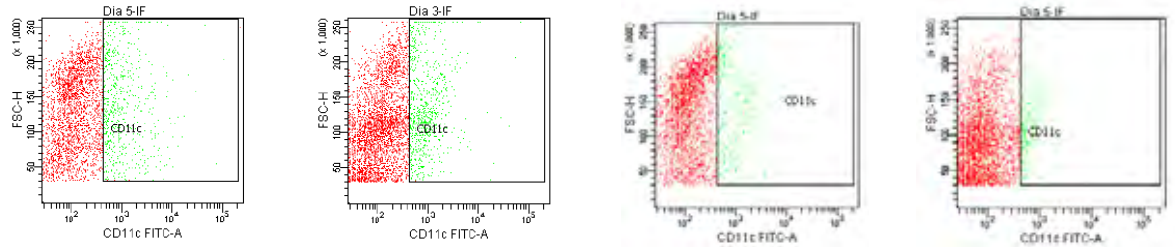
**Tabela 1** – Número absoluto de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e das subpopulações CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores mostrados referem-se ao “pool” de células das placas de Peyer de 12 animais para cada dia, obtidos em 30.000 eventos analisados por citometria de fluxo

Amostra	Animal	Células	Dias pós-infecção			Controle
			1º Dia	3º Dia	5º Dia	
YpIII pIB1	Balb/c	CD11c	237	487	592	352
		CD11cCD11b	27	164	285	21
		CD11cCD8α	43	142	208	102
	C57BL/6	CD11c	746	1011	484	1225
		CD11cCD11b	513	719	69	1010
		CD11cCD8α	498	553	167	865
YpIII	Balb/c	CD11c	358	722	627	352
		CD11cCD11b	27	73	27	21
		CD11cCD8α	49	90	23	102
	C57BL/6	CD11c	339	517	303	1225
		CD11cCD11b	15	22	17	1010
		CD11cCD8α	39	31	13	865



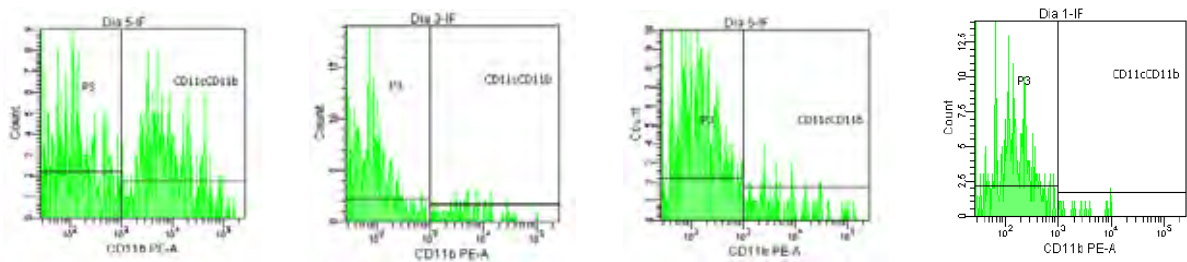
**Figura 1.** Número de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) (A) e subpopulações CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (B) e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> (C) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as amostras YpIII pIB1 e YpIII nos diferentes dias pós-infecção. A letra C corresponde aos animais não infectados (controles) e os números 1º, 3º e 5º correspondem aos dias pós-infecção.

### CD11c<sup>+</sup>



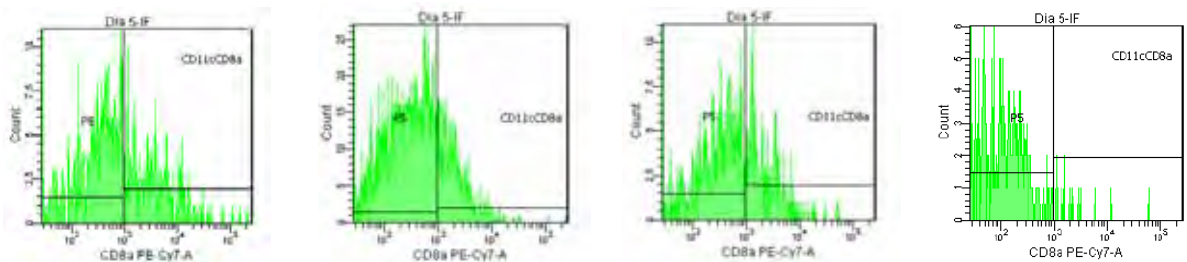
(A) BALB/c - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (B) BALB/c - Yp<sup>-</sup> - 3° dia p.i. (C) C57BL/6 - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (D) C57BL/6 - Yp<sup>-</sup> - 5° dia p.i.

### CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>



(E) BALB/c - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (F) BALB/c - Yp<sup>-</sup> - 3° dia p.i. (G) C57BL/6 - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (H) C57BL/6 - Yp<sup>-</sup> - 1° dia p.i.

### CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>



(I) BALB/c - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (J) BALB/c - Yp<sup>-</sup> - 5° dia p.i. (K) C57BL/6 - Yp<sup>+</sup> - 5° dia p.i. (L) C57BL/6 - Yp<sup>-</sup> - 5° dia p.i.

**Figura 2.** Principais alterações ocorridas no número de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e subpopulações CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> durante as infecções de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

#### 4.2. Análise das moléculas de superfície das células dendríticas

As expressões das moléculas de MHC de classe II, B7.1, B7.2 e ICAM-1 foram investigadas nas células dendríticas dos animais infectados com as amostras de *Y. pseudotuberculosis* no curso da infecção e comparadas com as expressões apresentadas pelos animais não infectados do mesmo grupo. Para tal, foram utilizados anticorpos específicos anti-CD11c, anti-I-A/I-E, anti-CD80, anti-CD86 e anti-CD54, marcados com fluorocromos, e a análise do percentual de células dendríticas que apresentavam esses marcadores foi realizada através de citometria de fluxo.

Devido ao número reduzido de células dendríticas presentes nas placas de Peyer utilizou-se um “pool” de células obtido das placas de Peyer de 12 animais para cada grupo e dia estudado. O percentual obtido de células dendríticas expressando essas moléculas, em uma análise de 30.000 eventos realizada por citometria de fluxo, foi representado na Tabela 2 e Figura 3.

A expressão de moléculas de MHC II nos grupos de animais controles não se mostrou tão diferente entre as duas linhagens de animais. Camundongos controles C57BL/6 apresentaram 78% de células dendríticas expressando essa molécula contra 75% dos animais BALB/c (Tabela 2 e Figuras 4 A e 4B).

Camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> apresentaram uma redução no número de células dendríticas que expressavam essa molécula no 1° e no 3° dia pós-infecção e um aumento no 5° dia (80,9%), valor um pouco acima do apresentado pelo seu grupo controle (Figura 4C). Os demais grupos de animais, BALB/c (Yp<sup>-</sup>), C57BL/6 (Yp<sup>+</sup>) e C57BL/6 (Yp<sup>-</sup>), apresentaram uma redução no número dessas células (Figuras 4D, 4E e 4F). A maior redução observada foi para o último grupo e durante todo o período do experimento (40,6% no 1° dia, 55,8% no 3° dia e 53,4% no 5° dia p.i.) (Figuras 3A e 4F).

Em relação à análise do percentual de células dendríticas que expressavam a molécula co-estimuladora B7.1 (CD80) verificou-se, inicialmente, que os animais controles C57BL/6 apresentaram um percentual maior em relação aos animais controles BALB/c (49,2% para 14,5%) (Tabela 2 e Figuras 4G e 4H).

Os animais infectados BALB/c (Yp<sup>+</sup>), apesar de terem apresentado uma redução no percentual de células dendríticas que expressavam a molécula B7.1 no 3° dia pós-infecção (11,6%), apresentaram um aumento da expressão dessa molécula no 1° e no 5° dia (25,8% e 35,8%, respectivamente) (Figura 4I). Os infectados com a amostra Yp<sup>-</sup> apresentaram redução da expressão dessa molécula durante todo o período analisado (Figuras 3B e 4J).



Já os camundongos C57BL/6 ( $Yp^+$ ) apresentaram um aumento no 1º dia (51,4%), mas uma redução da expressão dessa molécula nos demais dias (Figura 4K). Por sua vez, os C57BL/6 ( $Yp^-$ ) apresentaram uma intensa redução em todo o período de infecção (Figuras 3B e 4L).

Animais controles C57BL/6 apresentaram um percentual maior de células dendríticas que expressavam a molécula B7.2 (CD86) (34,9%) em relação aos animais controles Balb/c (7,0%) (Tabela 2 e Figuras 4M e 4N).

Apesar dos animais infectados da linhagem BALB/c terem apresentado aumento da expressão da molécula B7.2 no 1º dia p.i. para a amostra  $Yp^+$  (9,5%) e no 3º dia p.i. para a amostra  $Yp^-$  (8,3%), ambos os grupos apresentaram redução da expressão dessa molécula no final do período analisado, quando comparados com o seu grupo controle (Figuras 3C, 4O e 4P).

Os animais da linhagem C57BL/6 infectados com a amostra  $Yp^+$  apresentaram um aumento na expressão de B7.2 no 1º e no 3º dia (61,7% e 48,4%) e uma intensa redução no 5º p.i. (8,0%) (Figura 4Q). Os infectados com a amostra  $Yp^-$  apresentaram uma redução das células dendríticas que expressavam essa molécula em todo o período de infecção analisado (Figuras 3C e 4R).

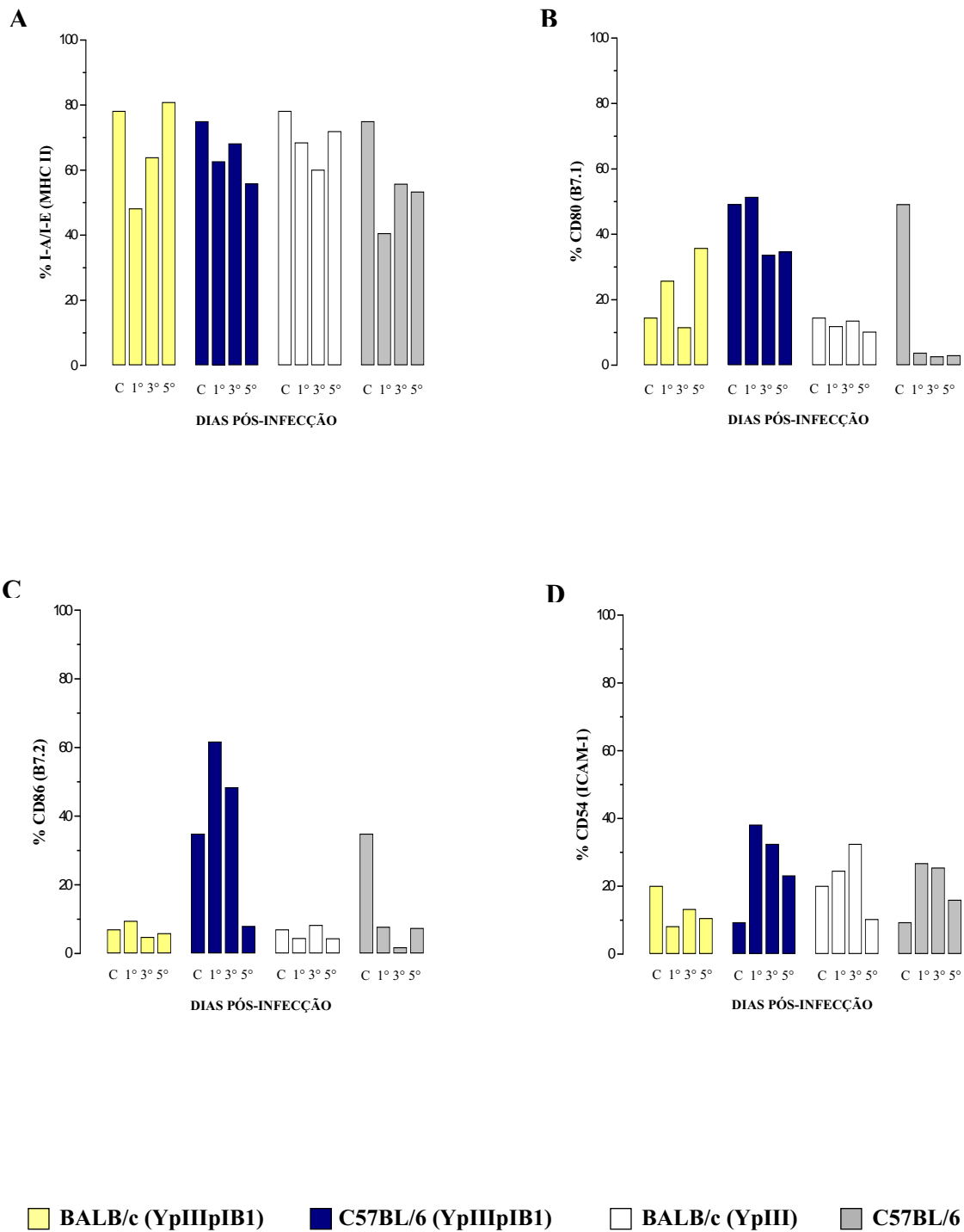
Camundongos controles BALB/c apresentaram um percentual maior de células dendríticas que expressavam a molécula ICAM-1 (CD54) (20,1%) em comparação aos camundongos controles C57BL/6 (9,4%) (Tabela 2 e Figuras 4S e 4T).

Durante todo período de infecção analisado para o grupo BALB/c ( $Yp^+$ ) observou-se uma redução no número das células dendríticas que expressavam essa molécula, com a maior redução no 1º dia pós-infecção (8,2%) (Figura 4U). No grupo BALB/c ( $Yp^-$ ) foram observados aumentos no 1º e no 3º dia (24,6% e 32,5%, respectivamente) e uma redução no 5º dia p.i (10,3%) (Figuras 3D e 4V).

Para os grupos de animais infectados C57BL/6 ( $Yp^+$  e  $Yp^-$ ) foram observados aumentos no número de células dendríticas que expressavam essa molécula em todo o período de infecção, com um maior aumento para a amostra portadora de plasmídeo de virulência (Figuras 3D, 4X e 4Z).

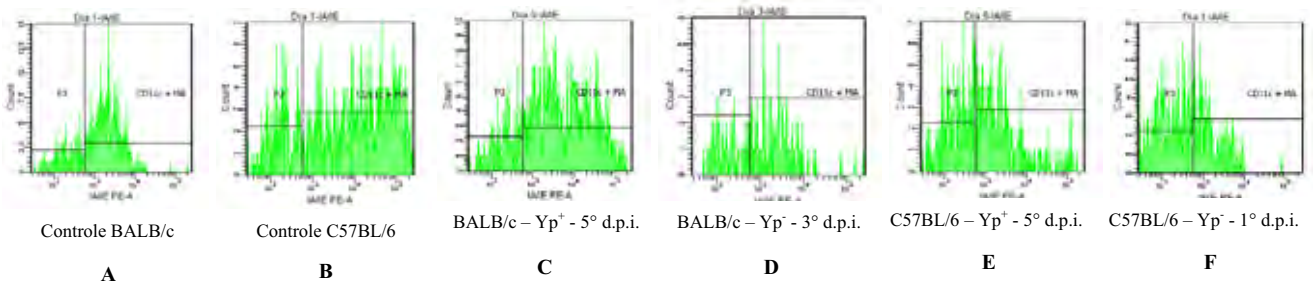
**Tabela 2** – Percentual de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados referem-se ao “pool” de células das placas de Peyer de 12 animais para cada dia, obtidos em 30.000 eventos analisados por citometria de fluxo

Amostra	Animal	Moléculas	Dias pós-infecção			Controle (%)
			1º Dia (%)	3º Dia (%)	5º Dia (%)	
YpIII pIB1	Balb/c	I-A/I-E (MHC II)	48,2	63,9	80,9	78,2
		CD80 (B7.1)	25,8	11,6	35,8	14,5
		CD86 (B7.2)	9,5	4,8	5,9	7,0
		CD54 (ICAM-1)	8,2	13,3	10,6	20,1
	C57BL/6	I-A/I-E (MHC II)	62,7	68,2	55,9	75,0
		CD80 (B7.1)	51,4	33,7	34,7	49,2
		CD86 (B7.2)	61,7	48,4	8,0	34,9
		CD54 (ICAM-1)	38,2	32,5	23,2	9,4
YpIII	Balb/c	I-A/I-E (MHC II)	68,5	60,1	72,0	78,2
		CD80 (B7.1)	11,9	13,6	10,2	14,5
		CD86 (B7.2)	4,5	8,3	4,4	7,0
		CD54 (ICAM-1)	24,6	32,5	10,3	20,1
	C57BL/6	I-A/I-E (MHC II)	40,6	55,8	53,4	75,0
		CD80 (B7.1)	3,8	2,7	3,0	49,2
		CD86 (B7.2)	7,8	1,8	7,4	34,9
		CD54 (ICAM-1)	26,8	25,5	16,0	9,4

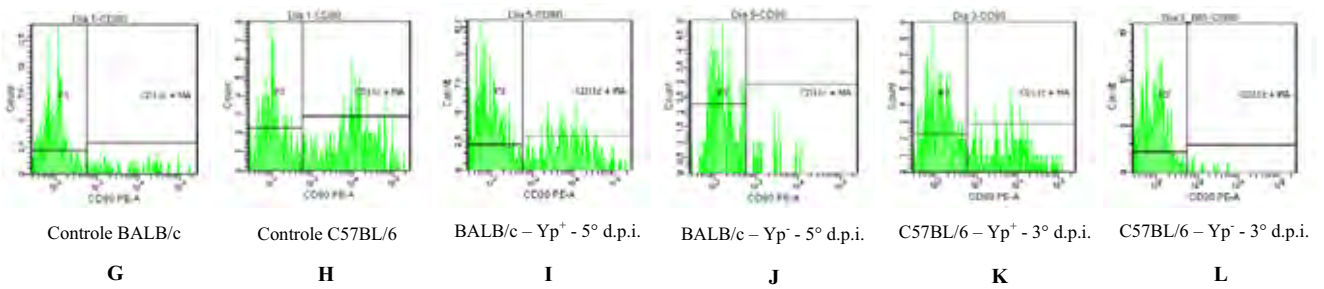


**Figura 3.** Percentual de células dendríticas expressando moléculas de MHC II (I-A/I-E) (A), B7.1 (CD80) (B), B7.2 (CD86) (C) e ICAM-1 (CD54) (D) de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as amostras YpIII pIB1 e YpIII nos diferentes dias pós-infecção. A letra C corresponde aos animais não infectados (controles) e os números 1º, 3º e 5º correspondem aos dias pós-infecção.

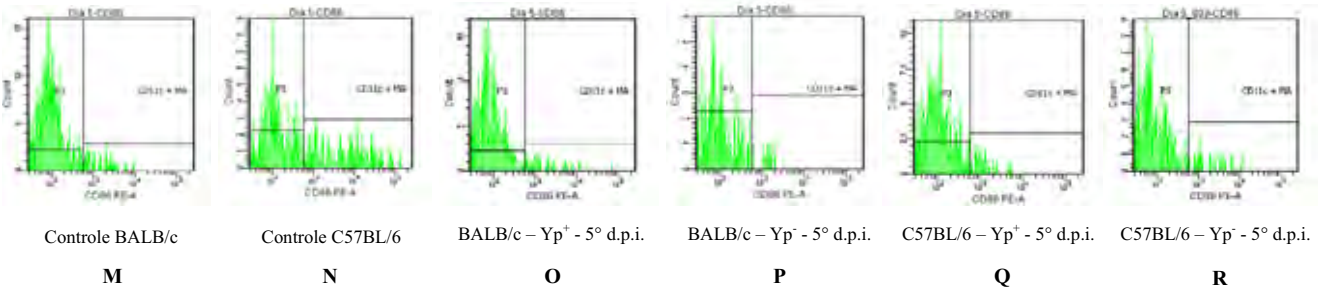
## MHC II



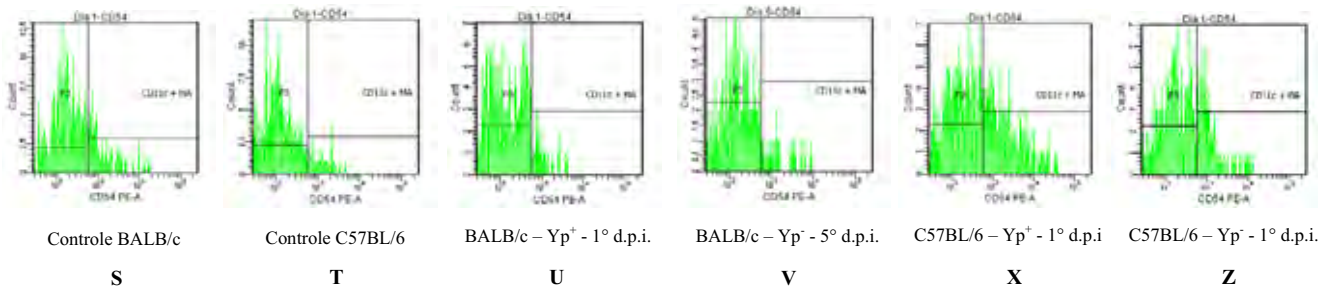
## B7.1



## B7.2



## ICAM-1



**Figura 4.** Principais alterações ocorridas no número de células dendríticas quanto à expressão de moléculas de MHC II, B7.1, B7.2 e ICAM-1 durante as infecções de camundongos BALB/c e C57BL/6 com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

### 4.3. Determinação das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ no sobrenadante de cultura de células dendríticas

Para estudar os efeitos da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis* em camundongos BALB/c e C57BL/6 sobre a secreção de citocinas pelas células dendríticas, as concentrações de IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  foram determinadas em sobrenadantes de culturas (48 horas) de células dendríticas das placas de Peyer. As concentrações dessas citocinas foram analisadas durante o curso da infecção (1 a 5 dias) e comparadas com as concentrações apresentadas pelos animais não infectados (controles).

Devido ao número reduzido de células dendríticas presente nas placas de Peyer utilizou-se um “pool” de células obtido das placas de Peyer de 12 animais para cada grupo e dia estudado. O método utilizado para as determinações de concentrações das citocinas foi o de ELISA e as culturas celulares foram realizadas nas condições sem estímulo (apenas em meio RPMI) e com os estímulos de HKY e LPS.

Em relação à produção de IL-4 verificou-se que, de uma maneira geral, camundongos BALB/c controles produziram maiores quantidades dessa citocina quando comparados aos camundongos C57BL/6 controles (Tabela 3).

As infecções por ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis*, sob as condições de estímulos e sem estímulo, produziram aumentos na produção de IL-4 nos camundongos BALB/c em comparação à produção dessa mesma citocina pelas DCs dos animais controles (Tabela 3 e Figuras 5A e 5B), principalmente no 3º dia p.i. e para a amostra Yp<sup>-</sup>.

Nas células dendríticas de camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> foi observado um aumento gradativo na produção dessa citocina a partir do 1º dia p.i., alcançando um pico máximo no 3º dia p.i. (13,8 vezes maior com o estímulo de HKY, 6,8 vezes maior com o estímulo de LPS e 9,3 vezes maior apenas com RPMI). No 5º dia p.i. a produção apresentou uma queda, porém mantendo-se mais elevada que a produção observada nos animais controles e um pouco maior que a produção observada no 1º dia p.i. para as células estimuladas com LPS e apenas com RPMI (Figura 5A).

Um comportamento semelhante foi observado na produção de IL-4 pelas DCs de camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>-</sup>. No 3º dia p.i. foram observados os maiores aumentos para essa linhagem de camundongo (aumentos 11,7 vezes maiores com o estímulo de HKY, 10,7 vezes maiores com o estímulo de LPS e 13,0 vezes maiores com RPMI). No 5º dia p.i. verificou-se uma redução da produção, com valores menores que os observados no 1º dia e maiores que a produção observada nos animais controles (Figura 5B).

As células dendríticas dos camundongos C57BL/6 infectados com as duas amostras bacterianas também apresentaram um aumento na produção de IL-4; entretanto, esses aumentos foram menores e mais discretos do que os aumentos de produção observados para os camundongos BALB/c (Tabela 3).

Camundongos infectados com a amostra  $Yp^+$  e sob o estímulo de HKY apresentaram no 1° dia p.i. uma produção 3,5 vezes maior do que a produção das DCs dos animais controles. A partir do 3° dia essa produção foi reduzida gradativamente e no 5° dia p.i. manteve-se ainda maior que a produção dos animais controles (Figura 5C). As células dendríticas sob o estímulo de LPS e com RPMI também apresentaram aumento na produção em todo o período analisado, com um pico de produção no 3° dia p.i. (3,2 vezes maior com LPS e 2,2 vezes maior com RPMI) (Figura 5C).

Nos camundongos C57BL/6 infectados com a amostra  $Yp^-$  e sob os estímulos de HKY e LPS foram observados aumentos gradativos a partir do 1° dia, alcançando o seu valor máximo de produção no 5° dia p.i. (6,2 vezes maior sob o estímulo de HKY e 5,0 vezes maior sob o estímulo de LPS) (Figura 5D). As células dendríticas desses animais cultivadas apenas com RPMI apresentaram um aumento na produção a partir do 1° dia, tendo o pico máximo ocorrido no 3° dia p.i. (3,5 vezes maior em relação aos animais controles) (Figura 5D).

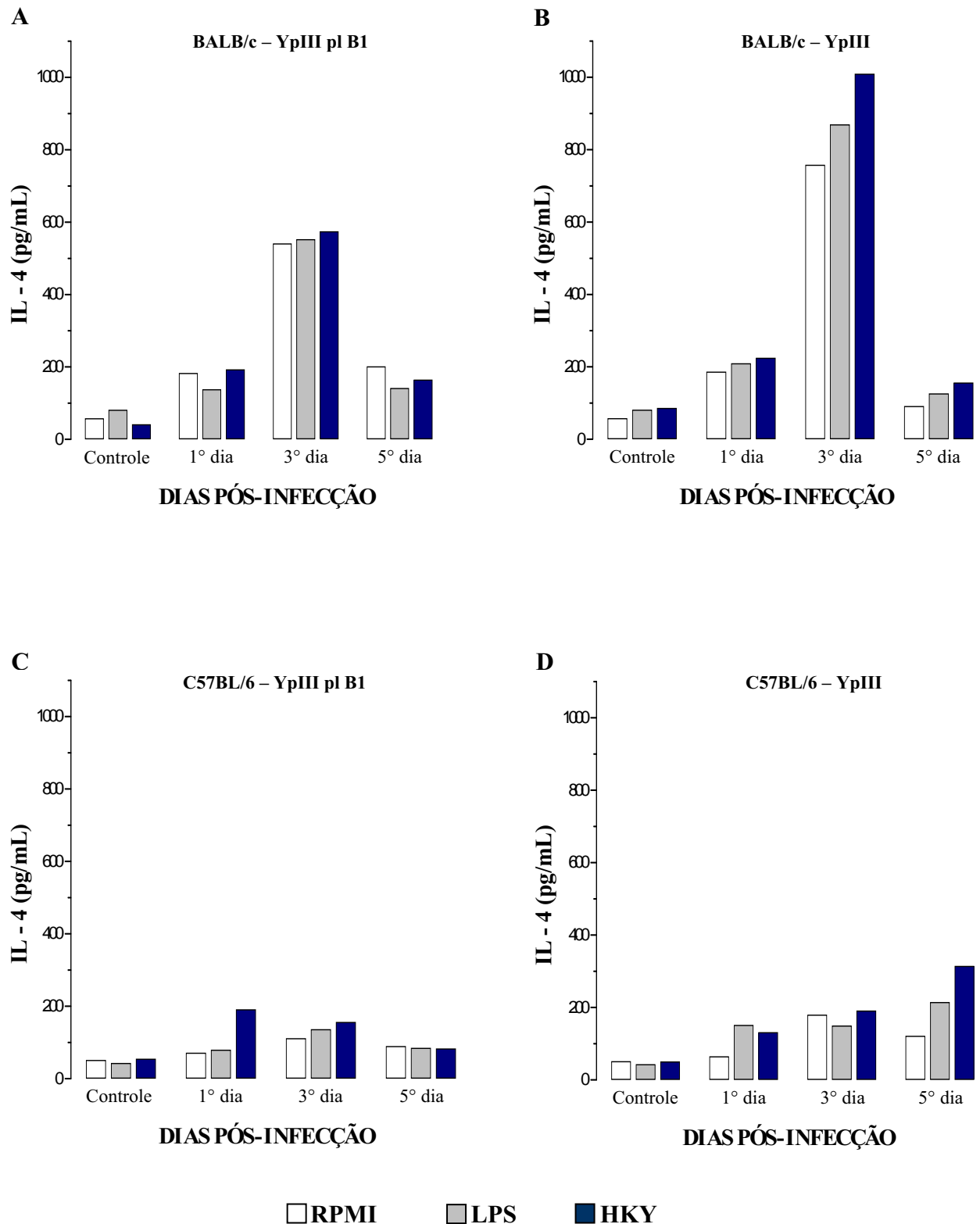
**Tabela 3** – Produção de IL-4 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

<b>Concentração de IL-4 (pg/mL)</b>						
<b>Animal</b>	<b>Amostra</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Dias pós-infecção</b>			
			<b>Controle</b>	<b>1º dia</b>	<b>3º dia</b>	<b>5º dia</b>
<b>BALB/C</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	41,50	193,17	574,83	164,83
		<b>LPS</b>	81,50	138,17	553,17	141,50
		<b>RPMI</b>	58,17	183,17	541,5	201,5
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	86,50	224,83	1009,83	156,50
		<b>LPS</b>	81,50	209,83	869,83	126,50
		<b>RPMI</b>	58,17	186,50	758,17	91,50
<b>C57BL/6</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	54,83	191,50	156,50	83,17
		<b>LPS</b>	43,17	79,83	136,50	84,83
		<b>RPMI</b>	51,50	71,50	111,50	89,83
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	50,67	131,50	191,50	314,83
		<b>LPS</b>	43,17	151,50	149,83	214,83
		<b>RPMI</b>	51,50	64,83	179,83	121,50

LPS: lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium

HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*

RPMI: sem estímulo



**Figura 5.** Concentrações de IL-4 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Células dendríticas dos animais infectados e controles foram cultivadas em meio RPMI e na presença dos estímulos de LPS e HKY. As concentrações dessa citocina foram determinadas pelo método de ELISA.



Quanto à produção de IL-10 por células dendríticas, de uma maneira geral, camundongos BALB/c controles produziram maiores quantidades dessa citocina quando comparados aos camundongos C57BL/6 controles (Tabela 4).

A infecção pela amostra  $Yp^+$  em camundongos BALB/c desencadeou os maiores aumentos na produção dessa citocina pelas células dendríticas das placas de Peyer, seguida da infecção pela amostra  $Yp^-$  em camundongos C57BL/6 (Tabela 4).

Nas células dendríticas de camundongos BALB/c infectados com a amostra  $Yp^+$  e sob os estímulos de HKY e LPS foi observado um aumento gradativo na produção dessa citocina a partir do 1º dia p.i., alcançando um pico máximo no 3º dia p.i. (12,1 vezes maior com o estímulo de HKY e 10,2 vezes maior com o estímulo de LPS). As células dendríticas cultivadas apenas na presença de RPMI também apresentaram um aumento gradativo a partir do 1º dia p.i. e obtiveram um pico máximo de produção no 5º dia p.i. (4,1 vezes maior que a produção verificada pelas células dendríticas dos animais controles) (Figura 6A).

As produções de IL-10 pelas DCs dos camundongos BALB/c infectados com a amostra  $Yp^-$ , sob o estímulo de HKY e sem nenhum estímulo (RPMI), tiveram seus maiores aumentos do 3º dia p.i. (3,1 vezes maior e 3,6 vezes maior, respectivamente). No 5º dia ocorreram reduções nas suas produções, mas que ainda apresentaram-se maiores que as produções dos animais controles e as produções dos animais infectados no 1º dia pós-infecção. Quando estimuladas com LPS, apresentaram um aumento na produção durante todo período analisado, com o maior aumento observado no 5º dia p.i. (3,4 vezes maior) (Figura 6B).

A infecção pela amostra  $Yp^+$  em camundongos C57BL/6 desencadeou um aumento de produção de IL-10 pelas células dendríticas em todo o período da infecção. Os maiores aumentos foram observados no 5º dia p.i. (3,6 vezes maior para o estímulo de HKY, 2,9 vezes maior para o LPS e 2,5 vezes maior para o RPMI) (Figura 6C). A infecção pela amostra  $Yp^-$  também produziu aumentos em todo o período analisado, com uma maior produção verificada no 3º dia p.i. (4,9 vezes maior na cultura com o HKY, 5,2 vezes maior na cultura com o LPS e 5,3 vezes maior na cultura com RPMI) (Figura 6D).

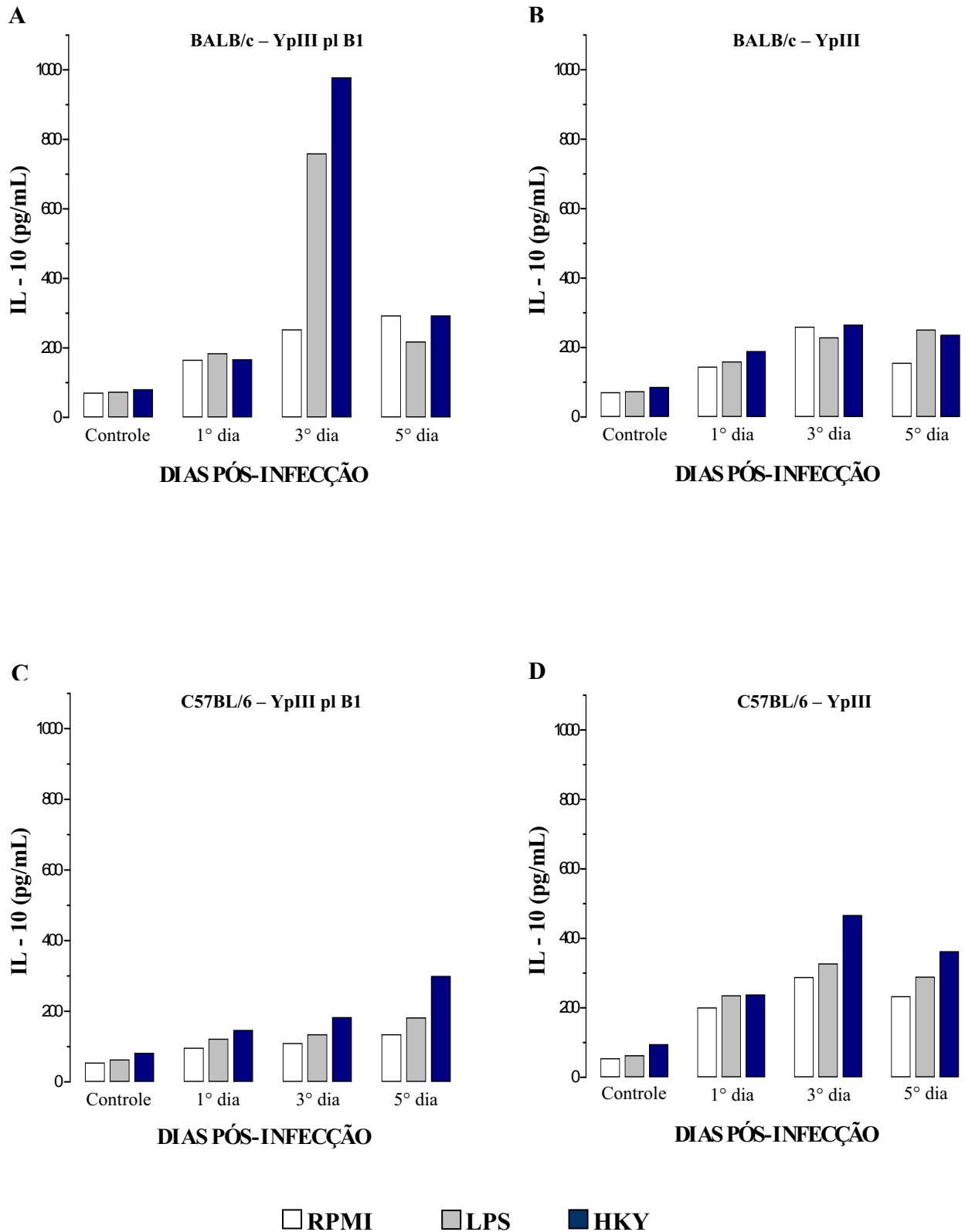
**Tabela 4** – Produção de IL-10 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

<b>Concentração de IL-10 (pg/mL)</b>						
<b>Animal</b>	<b>Amostra</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Dias pós-infecção</b>			
			<b>Controle</b>	<b>1º dia</b>	<b>3º dia</b>	<b>5º dia</b>
<b>BALB/C</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	81,00	167,25	978,50	293,50
		<b>LPS</b>	74,13	184,75	759,75	218,50
		<b>RPMI</b>	71,00	166,00	253,50	293,50
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	86,63	189,75	266,00	236,63
		<b>LPS</b>	74,13	159,75	229,13	251,63
		<b>RPMI</b>	71,00	144,75	259,75	156,00
<b>C57BL/6</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	82,25	147,25	183,50	299,75
		<b>LPS</b>	63,50	122,25	134,75	182,25
		<b>RPMI</b>	54,75	96,63	109,75	134,75
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	95,38	238,50	467,25	362,88
		<b>LPS</b>	63,50	236,00	327,88	289,75
		<b>RPMI</b>	54,75	201,00	288,50	233,50

LPS: lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium

HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*

RPMI: sem estímulo



**Figura 6.** Concentrações de IL-10 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Células dendríticas dos animais infectados e controles foram cultivadas em meio RPMI e na presença dos estímulos de LPS e HKY. As concentrações dessa citocina foram determinadas pelo método de ELISA.

A produção da citocina IL-12 pelas células dendríticas das placas de Peyer foi a maior entre as produções de citocinas investigadas. Essa produção foi, no mínimo, 10 vezes maior que as produções ocorridas para as demais citocinas nos dois grupos de animais controles (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

As concentrações de IL-12 produzidas pelas células dendríticas dos animais controles foram maiores nos camundongos C57BL/6. Sua maior produção, dentre os animais infectados, ocorreu nos camundongos C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>+</sup>, no 3º dia p.i. (Tabela 5).

Nos camundongos BALB/c, as infecções com as amostras de *Y. pseudotuberculosis* produziram aumentos gradativos a partir do 1º dia p.i., atingindo o máximo de produção no 5º dia p.i. De modo geral, a produção de IL-12 foi maior nos animais infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> (3,8 vezes maior que a produção ocorrida nos animais controle com o estímulo de HKY, 3,5 vezes maior com o LPS e 3,6 vezes maior com o RPMI) (Figura 7A). Para a amostra Yp<sup>-</sup> esses aumentos foram de 3,9 vezes maiores para o estímulo de HKY, 3,1 vezes maiores para o LPS e 2,8 vezes maiores para o RPMI (Figura 7B).

A infecção pela amostra Yp<sup>+</sup> em camundongos C57BL/6 provocou aumentos na produção de IL-12 pelas células dendríticas em todo o período analisado, e com um maior aumento observado no 3º dia p.i. (3,1 vezes maior com o estímulo de HKY, 3,1 vezes maior com o estímulo de LPS e 2,9 vezes maior apenas com RPMI) (Figura 7C). A infecção pela amostra Yp<sup>-</sup> também produziu aumentos na produção dessa citocina em todo o período analisado, e com uma produção máxima observada no 5º dia p.i. (2,8 vezes maior com o HKY, 2,5 vezes maior com o LPS e 2,5 vezes maior com o RPMI) (Figura 7D).

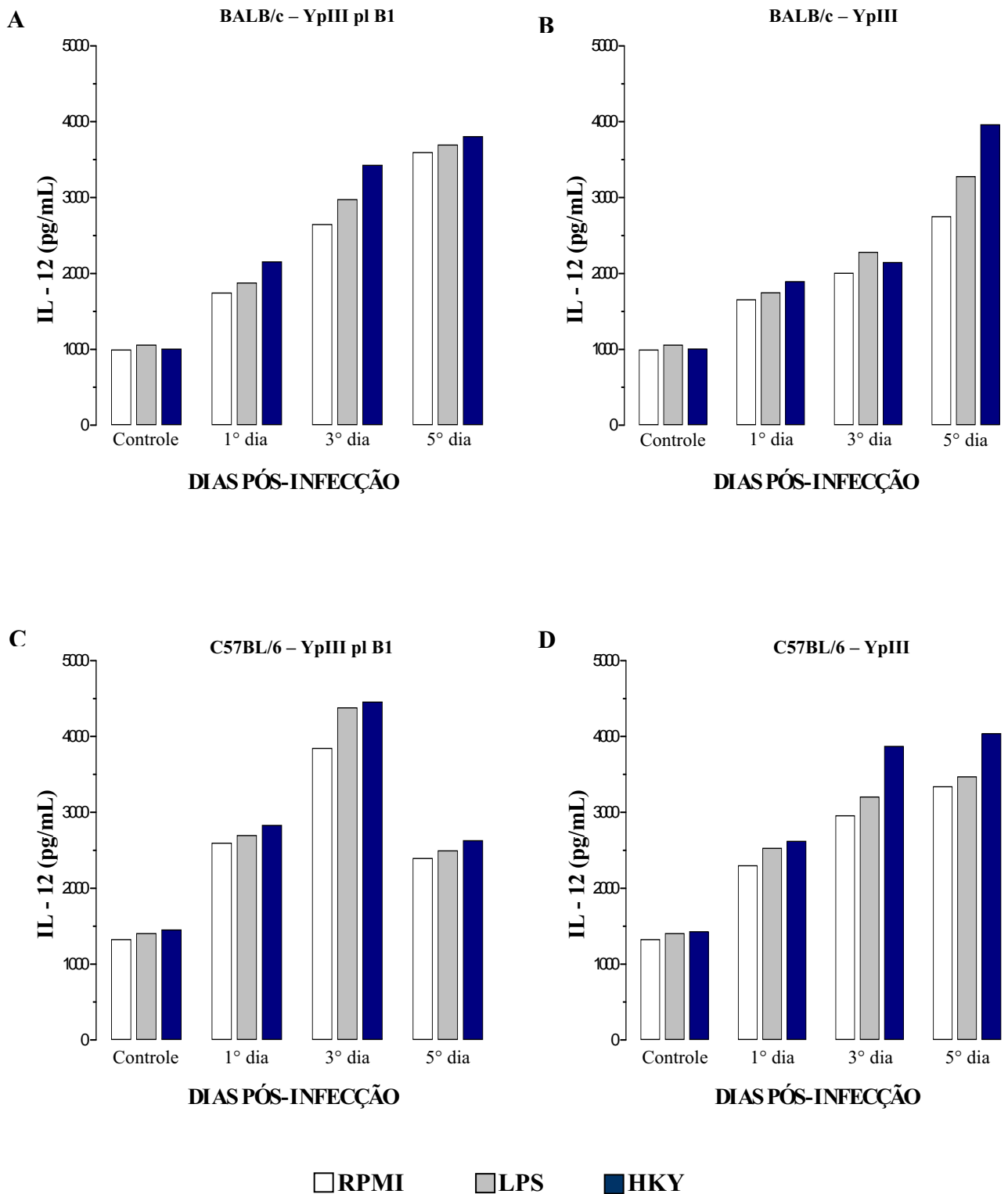
**Tabela 5** – Produção de IL-12 por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

<b>Concentração de IL-12 (pg/mL)</b>						
<b>Animal</b>	<b>Amostra</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Dias pós-infecção</b>			
			<b>Controle</b>	<b>1º dia</b>	<b>3º dia</b>	<b>5º dia</b>
<b>BALB/C</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	1009,0	2159,0	3431,5	3809,0
		<b>LPS</b>	1061,5	1879,0	2979,0	3699,0
		<b>RPMI</b>	996,5	1749,0	2651,5	3599,0
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	1011,5	1899,0	2151,5	3966,5
		<b>LPS</b>	1061,5	1751,5	2284,0	3284,0
		<b>RPMI</b>	996,5	1659,0	2009,0	2754,0
<b>C57BL/6</b>	<b>YpIII pIB1</b>	<b>HKY</b>	1456,5	2834,0	4459,0	2634,0
		<b>LPS</b>	1409,0	2699,0	4384,0	2499,0
		<b>RPMI</b>	1329,0	2599,0	3849,0	2399,0
	<b>YpIII</b>	<b>HKY</b>	1434,0	2624,0	3876,5	4044,0
		<b>LPS</b>	1409,0	2531,5	3209,0	3474,0
		<b>RPMI</b>	1329,0	2304,0	2961,5	3344,0

LPS: lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium

HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*

RPMI: sem estímulo



**Figura 7.** Concentrações de IL-12 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII plB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Células dendríticas dos animais infectados e controles foram cultivadas em meio RPMI e na presença dos estímulos de LPS e HKY. As concentrações dessa citocina foram determinadas pelo método de ELISA.

Em relação à produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas das placas de Peyer, camundongos C57BL/6 controles apresentaram uma maior produção dessa citocina quando comparados aos camundongos BALB/c controles (Tabela 6).

As células dendríticas dos camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> apresentaram um aumento na produção de TNF- $\alpha$  a partir do 1º dia pós-infecção, atingindo o seu maior aumento no 5º dia p.i. (aumentos de 8,8 vezes com o estímulo de HKY, 10,8 vezes com o estímulo de LPS e 9,3 vezes com RPMI) (Figura 8A).

Os mesmos animais infectados com a amostra Yp<sup>-</sup> e com o estímulo de HKY apresentaram aumentos na produção em todo o período analisado, com um pico de produção no 3º dia pós-infecção (7,6 vezes maior). Para o cultivo com LPS e apenas com RPMI, os aumentos na produção ocorreram a partir do 1º dia e seu aumento máximo ocorreu no 5º dia pós-infecção (14,3 vezes com o estímulo de LPS e 6,8 vezes com o RPMI) (Figura 8B).

Os camundongos C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> apresentaram logo no início da infecção, no 1º dia, a maior produção observada durante o período analisado (5 vezes maior com o estímulo de HKY, 6 vezes maior com o estímulo de LPS e 6,7 vezes maior com o RPMI), e que foi, aos poucos, reduzindo-se até o 5º dia pós-infecção. Mesmo assim, no 5º dia a produção manteve-se ainda maior do que a produção observada nos animais controle (Figura 8C).

Os camundongos C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>-</sup> apresentaram um aumento na produção dessa citocina em todo o período analisado, com os maiores aumentos ocorridos no 5º dia pós-infecção (aumento 6,7 vezes maior que a produção observada nos animais controles com o estímulo do HKY, 8,6 vezes maior com o LPS e 6,8 vezes maior com o RPMI) (Figura 8D).

**Tabela 6** – Produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante infecção com *Y. pseudotuberculosis* e grupo controle

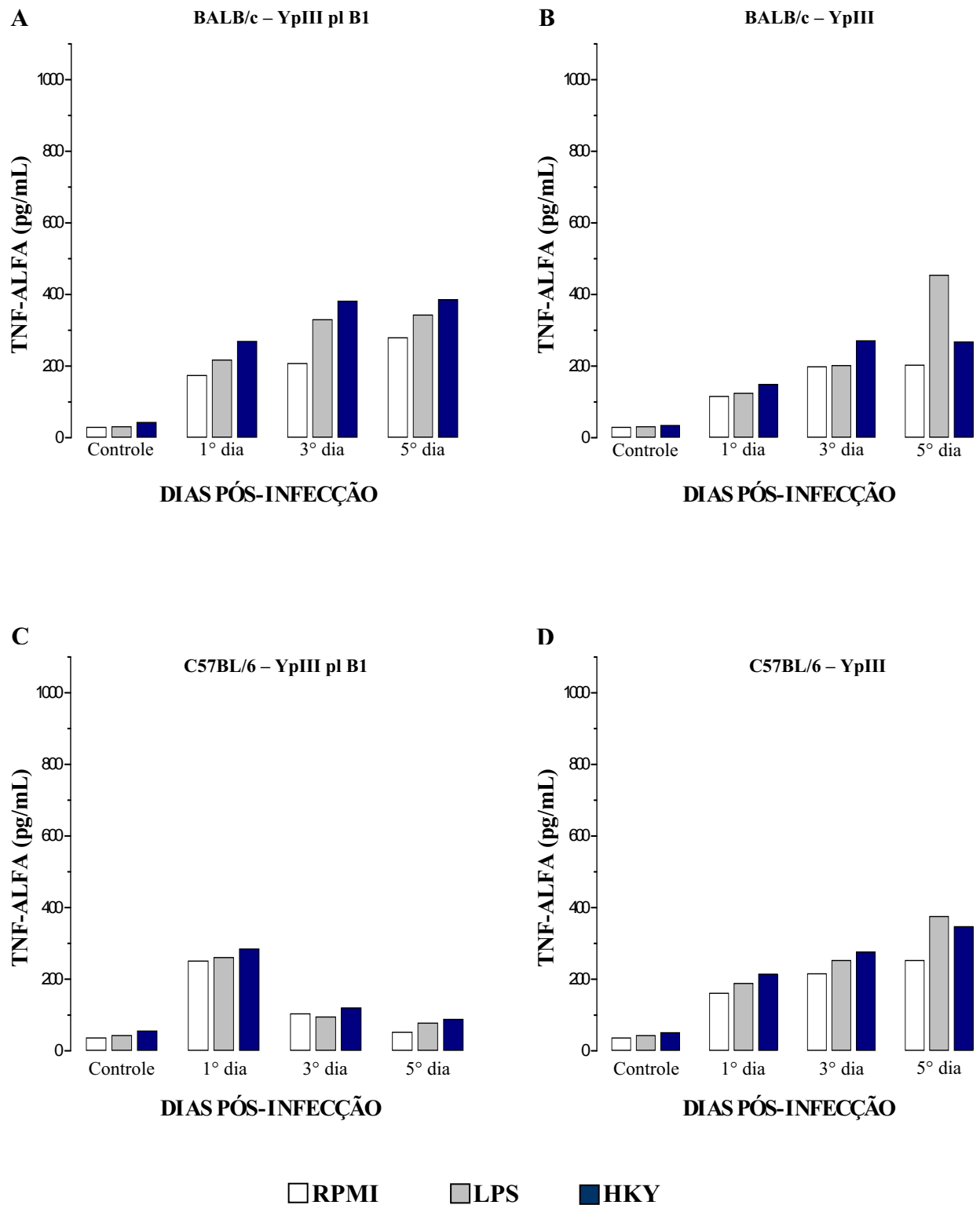
Concentração de TNF- $\alpha$ (pg/mL)						
Animal	Amostra	Estímulo	Dias pós-infecção			
			Controle	1º dia	3º dia	5º dia
BALB/C	YpIII pIB1	HKY	43,73	270,09	382,36	386,45
		LPS	31,91	218,27	331,00	343,73
		RPMI	30,09	175,09	208,27	280,09
	YpIII	HKY	35,55	150,09	271,91	268,73
		LPS	31,91	125,55	202,82	455,09
		RPMI	30,09	116,45	199,18	203,73
C57BL/6	YpIII pIB1	HKY	56,45	285,55	121,00	89,18
		LPS	43,73	261,91	95,55	78,27
		RPMI	37,36	251,91	104,64	52,82
	YpIII	HKY	51,91	215,55	276,91	348,27
		LPS	43,73	189,18	253,73	376,45
		RPMI	37,36	161,91	216,45	253,73

LPS: lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium

HKY: antígeno de *Y. pseudotuberculosis*

RPMI: sem estímulo





**Figura 8.** Concentrações de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de culturas de células dendríticas das placas de Peyer dos camundongos BALB/c e C57BL/6 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Células dendríticas dos animais infectados e controles foram cultivadas em meio RPMI e na presença dos estímulos de LPS e HKY. As concentrações dessa citocina foram determinadas pelo método de ELISA.

#### 4.4. Determinação da ativação de células T Ag-específicas

A capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas das placas de Peyer dos animais infectados e controles foi analisada através de co-cultura com linfócitos T e determinação da proliferação das células T por citometria de fluxo usando o CFSE.

Devido ao número reduzido de células dendríticas presente nas placas de Peyer utilizou-se um “pool” de células obtido das placas de Peyer de 6 animais para cada grupo e dia estudado.

Células T dos baços de animais imunizados com HKY foram marcadas com CFSE e co-cultivadas com as células dendríticas provenientes dos camundongos infectados e controles que foram, anteriormente, pré-incubadas com o antígeno de *Yersinia* (HKY). Após 4 dias, linfócitos T marcados com CFSE e não estimulados e linfócitos T marcados com CFSE e estimulados (co-cultivados com células dendríticas) foram marcados com anti-CD3 e anti-CD4. A medida da intensidade de fluorescência do CFSE dos linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foi realizada por citometria de fluxo.

A análise da proliferação das células T foi verificada através do Índice de Proliferação (IP) ou Razão da Mediana de Intensidade de Fluorescência (RMIF). Esse índice foi determinado através da razão da mediana de intensidade de fluorescência obtida para os linfócitos marcados com CFSE e não estimulados (células que não proliferaram e que apresentaram intensidade de fluorescência máxima), pela mediana de intensidade de fluorescência obtida para os linfócitos marcados com CFSE e estimulados ou co-cultivados com células dendríticas (células que proliferaram e que reduziram a intensidade de fluorescência do CFSE).

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos para os camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as amostras de *Y. pseudotuberculosis*.

**Tabela 7** – Análise da capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas das placas de Peyer através da determinação da proliferação de células T CD4<sup>+</sup>.

Animal	Amostra bacteriana	Índice de Proliferação (IP)			
		Dias pós-infecção			Controles
		1°	3°	5°	
BALB/c	YpIII pIB1	1,25	1,29	1,15	1,04
	YpIII	1,13	0,88	0,41	0,88
C57BL/6	YpIII pIB1	1,64	2,15	0,93	1,01
	YpIII	0,64	0,41	2,09	0,90

De um modo geral, não foram observadas diferenças nas capacidades das células dendríticas de estimularem as células T CD4<sup>+</sup> entre os animais controles BALB/c e C57BL/6.

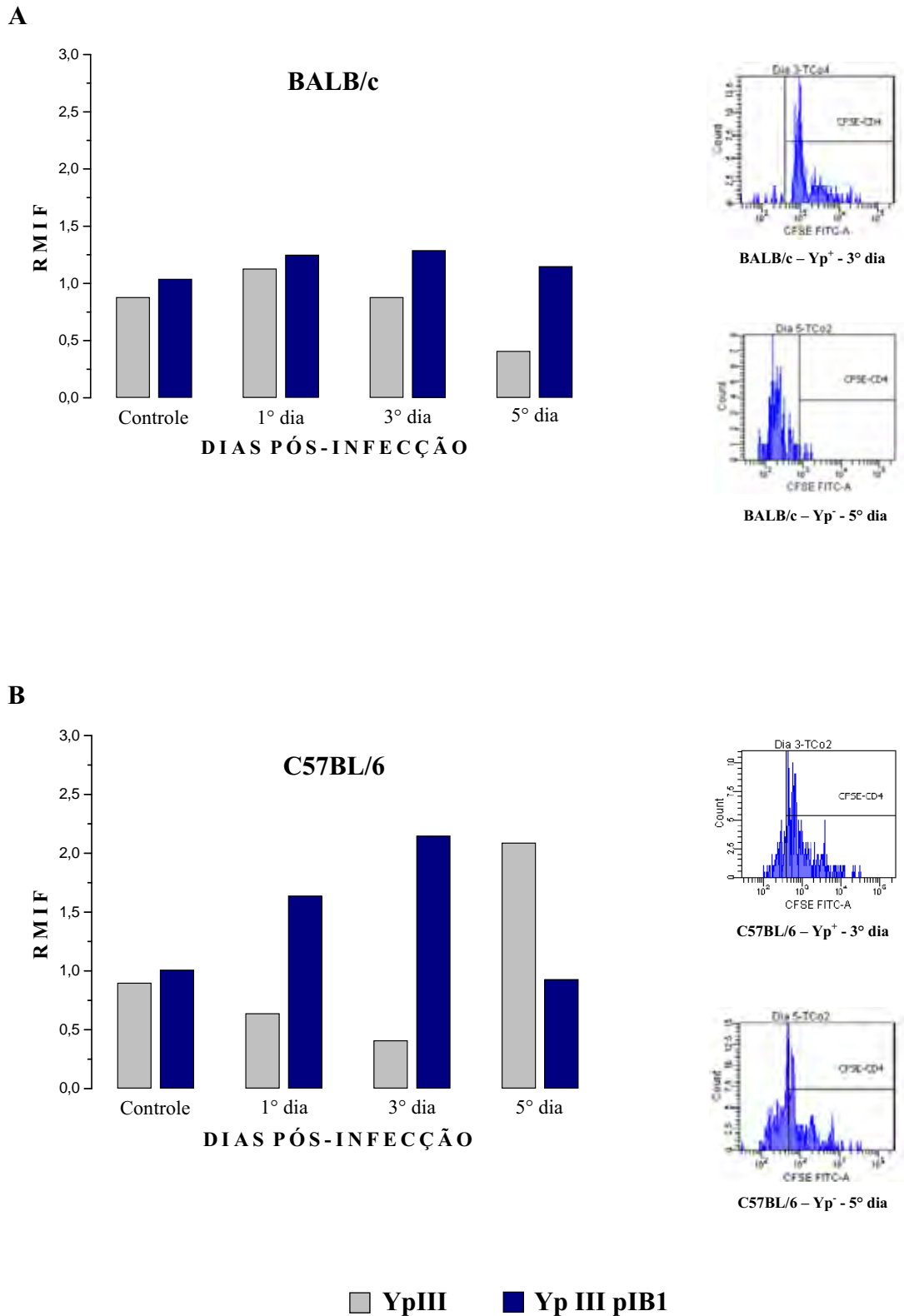
A infecção por *Y. pseudotuberculosis* em camundongos BALB/c aumentou pouco a capacidade das células dendríticas de estimularem as células T CD4<sup>+</sup> dos animais imunizados. Em camundongos C57BL/6 a capacidade das células dendríticas de estimularem as células T foi maior quando comparada aos camundongos BALB/c.

Um IP maior para os camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> em relação aos animais controles sugeriu um aumento da capacidade das células dendríticas de estimularem as células T nesses animais. Esse aumento foi discreto, iniciou-se a partir do 1º dia, teve seu maior aumento no 3º dia (1,2 vezes maior) e perdurou durante todo o período analisado (Figura 9A).

Camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>-</sup> apresentaram um aumento da capacidade das células dendríticas de estimularem as células T no início da infecção (1º dia). No 3º dia, essa capacidade se igualou à capacidade das células dendríticas dos animais controles e diminuiu no 5º dia (2,1 vezes menor) (Figura 9A).

As células dendríticas dos camundongos C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> apresentaram um aumento da capacidade de estímulo a partir do 1º dia, atingiram uma capacidade máxima no 3º dia (2,1 vezes maior) e reduziram essa capacidade no 5º dia, apresentando uma RMIF próxima à razão obtida para os animais controles (Figura 9B).

A capacidade das DCs dos camundongos C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>-</sup> foi reduzida gradativamente até o 3º dia, e no 5º dia teve um aumento de 2,3 vezes em relação aos animais controles (Figura 9B).



**Figura 9.** Influência da infecção por *Y. pseudotuberculosis* com as amostras YpIII pIB1 e YpIII sobre a capacidade de células dendríticas estimularem a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> em camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B). A proliferação celular foi mensurada através de citometria de fluxo, utilizando-se o ensaio de proliferação de células T com CFSE. Os histogramas à direita das figuras A e B apresentam as principais alterações ocorridas.

#### 4.5. Análise fenotípica dos linfócitos T das placas de Peyer

As populações de LT, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> provenientes das placas de Peyer dos camundongos Balb/c e C57BL/6 foram quantificadas no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após a infecção com as amostras YpIII pIB1(Yp<sup>+</sup>) e YpIII (Yp<sup>-</sup>). As mesmas populações de linfócitos, porém provenientes de animais não infectados, também foram quantificadas e os valores obtidos serviram como controles.

Quanto à quantificação dos linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), os animais controles do grupo C57BL/6 apresentaram um número maior de linfócitos em relação ao grupo controle BALB/c (1,5 vezes maior) (Tabela 8).

Analisando os animais infectados em relação ao seu grupo controle foi possível verificar que os camundongos BALB/c infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> apresentaram um aumento de linfócitos T no 3<sup>o</sup> dia pós-infecção, mas que não se mostrou significativo (Figura 10A). O grupo infectado com a amostra Yp<sup>-</sup> apresentou um aumento a partir do 1<sup>o</sup> dia pós-infecção, tornando-se significativo no 3<sup>o</sup> dia (1,48 vezes maior), e uma redução no 5<sup>o</sup> dia (Figura 10B).

Ambos os grupos de camundongos C57BL/6 infectados apresentaram uma redução no número de linfócitos T. Essa redução foi significativa em todo o período de infecção analisado, com a maior redução observada no 1<sup>o</sup> dia (2,37 vezes menor para a amostra Yp<sup>+</sup> e 1,92 vezes menor para a amostra Yp<sup>-</sup>) (Figuras 10C e 10D).

Em relação à quantificação dos linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, camundongos BALB/c controles apresentaram um número maior comparados aos camundongos C57BL/6 controles (1,15 vezes maior) (Tabela 8).

Aumentos significativos ocorreram em todo o período de cinética realizado nos animais BALB/c infectados com a amostra portadora de plasmídeo de virulência (3,48 vezes maior no 1<sup>o</sup> dia, 2,41 vezes maior no 3<sup>o</sup> dia e 3,44 vezes maior no 5<sup>o</sup> dia p.i.) (Figuras 10A e 11A). Nos animais infectados com a amostra curada do plasmídeo, esse aumento ocorreu de forma significativa apenas no 3<sup>o</sup> dia (2,76 vezes maior) (Figuras 10B e 11B).

Nos animais C57BL/6 infectados com a amostra portadora de plasmídeo de virulência, aumentos significativos ocorreram no 1<sup>o</sup> e no 3<sup>o</sup> dia pós-infecção, sendo o maior aumento observado nesse 3<sup>o</sup> dia (1,83 e 2,29 vezes maior, respectivamente) (Figuras 10C e 11C). Nos animais infectados com a amostra curada do plasmídeo de virulência, um aumento significativo foi observado no 5<sup>o</sup> dia pós-infecção (1,43 vezes maior) (Figuras 10D e 11D).

Entre os grupos de animais controles, os camundongos C57BL/6 apresentaram uma contagem maior de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (2,24 vezes maior) (Tabela 8).

O grupo BALB/c infectado com a amostra  $Yp^+$  apresentou aumentos significativos em todo o período da cinética, sendo o maior aumento observado no 5º dia (3,83 vezes maior) (Figuras 10A e 11E). O infectado com a amostra  $Yp^-$  apresentou aumentos significativos no 3º e no 5º dia, sendo o maior aumento observado no 3º dia (3,14 vezes maior) (Figuras 10B e 11F).

Camundongos C57BL/6 infectados com a amostra  $Yp^+$  apresentaram aumentos significativos no 3º dia pós-infecção (1,45 vezes maior) (Figuras 10C e 11G). Nos infectados com a amostra  $Yp^-$  não foram observadas alterações significativas (Figura 10D).

Comparando as contagens de CD3 entre os diferentes grupos de animais infectados e para o 1º dia pós-infecção não foram observadas diferenças significativas. No 3º dia foram observadas diferenças significativas entre os grupos Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^+$ ) e Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ) (maior diferença, com  $p = 0,016$ ). No 5º dia não foram observadas alterações significativas entre as contagens de CD3 (Tabela 8).

Para os valores obtidos de LT- $CD4^+$  durante o 1º dia pós-infecção entre os diferentes grupos de animais infectados foi possível observar diferenças significativas entre os animais Balb/c ( $Yp^+$ ) e Balb/c ( $Yp^-$ ) (maior diferença, com  $p = 0,035$ ), Balb/c ( $Yp^+$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ), e C57BL/6 ( $Yp^+$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ). No 3º dia pós-infecção, as diferenças encontradas foram entre os grupos Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^+$ ), Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ) (maior diferença, com  $p = 0,00002$ ) e C57BL/6 ( $Yp^+$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ). No 5º dia, diferenças significativas foram observadas apenas para os grupos Balb/c ( $Yp^+$ ) e C57BL/6 ( $Yp^+$ ) ( $p = 0,048$ ) (Tabela 8).

Para os valores obtidos de LT- $CD8^+$  durante o 1º dia pós-infecção, diferenças significativas foram observadas para os grupos Balb/c ( $Yp^+$ ) e Balb/c ( $Yp^-$ ), Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^+$ ) (maior diferença, com  $p = 0,0036$ ), e Balb/c ( $Yp^-$ ) e C57BL/6 ( $Yp^-$ ). Para o 3º e 5º dias não foram observadas diferenças significativas (Tabela 8).

De maneira geral, as infecções por *Y. pseudotuberculosis* com ambas as amostras bacterianas provocaram um aumento no número de linfócitos T ( $CD3^+$ ) em camundongos BALB/c, principalmente com a amostra não portadora do plasmídeo de virulência; e uma diminuição no número de linfócitos T ( $CD3^+$ ) em camundongos C57BL/6, principalmente com a amostra portadora do plasmídeo de virulência. Essas infecções, para ambas as linhagens de animais, provocaram um aumento no número de linfócitos T  $CD4^+$ , principalmente em camundongos BALB/c infectados com a amostra  $Yp^+$ . Em relação aos linfócitos T  $CD8^+$ , as infecções com ambas as amostras bacterianas provocaram um aumento no número desses linfócitos em camundongos BALB/c, principalmente com a amostra  $Yp^+$ .

Em camundongos C57BL/6, aumentos significativos para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram observados apenas na infecção com a amostra Yp<sup>+</sup>.

**Tabela 8** - Número absoluto de linfócitos T e das subpopulações CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> das placas de Peyer dos animais infectados e controles no decorrer da infecção com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais para cada dia

Animal	Amostra bacteriana	População linfocitária	Nº de linfócitos / animal (x 10 <sup>5</sup> )			
			Dias pós-infecção			Controles
			1º	3º	5º	
BALB/c	YpIII pIB1	CD3	22,6 $\pm$ 10,2	27,1 $\pm$ 10,3	21,3 $\pm$ 16,2	24,5 $\pm$ 10,9
		CD4	11,1 $\pm$ 6,39* $\diamond^{1,2}$	7,77 $\pm$ 5,64*	11,0 $\pm$ 8,01* $\diamond^1$	3,19 $\pm$ 2,19
		CD8	2,88 $\pm$ 1,43* $\Delta^1$	2,46 $\pm$ 1,51*	3,29 $\pm$ 2,64*	0,86 $\pm$ 0,45
	YpIII	CD3	27,7 $\pm$ 12,6	36,3 $\pm$ 10,6* $\emptyset^{1,2}$	17,4 $\pm$ 4,69	24,5 $\pm$ 10,9
		CD4	3,70 $\pm$ 1,83 $\diamond^1$	8,80 $\pm$ 1,44* $\diamond^{1,2}$	4,48 $\pm$ 1,70	3,19 $\pm$ 2,19
		CD8	1,08 $\pm$ 0,43 $\Delta^{1,2,3}$	2,70 $\pm$ 0,62*	1,53 $\pm$ 0,45*	0,86 $\pm$ 0,45
C57BL/6	YpIII pIB1	CD3	15,5 $\pm$ 2,83*	22,6 $\pm$ 5,67* $\emptyset^1$	21,7 $\pm$ 11,5*	36,8 $\pm$ 13,6
		CD4	5,06 $\pm$ 1,56* $\diamond^3$	6,31 $\pm$ 2,22* $\diamond^{1,3}$	2,70 $\pm$ 1,64 $\diamond^1$	2,76 $\pm$ 0,89
		CD8	2,07 $\pm$ 0,65 $\Delta^2$	2,81 $\pm$ 0,95*	1,77 $\pm$ 0,95	1,93 $\pm$ 0,86
	YpIII	CD3	19,2 $\pm$ 4,59*	20,8 $\pm$ 4,04* $\emptyset^2$	24,6 $\pm$ 5,48*	36,8 $\pm$ 13,6
		CD4	3,53 $\pm$ 1,02 $\diamond^{2,3}$	2,73 $\pm$ 0,83 $\diamond^{2,3}$	3,94 $\pm$ 0,98*	2,76 $\pm$ 0,89
		CD8	1,97 $\pm$ 0,50 $\Delta^3$	1,62 $\pm$ 0,44	2,06 $\pm$ 0,62	1,93 $\pm$ 0,86

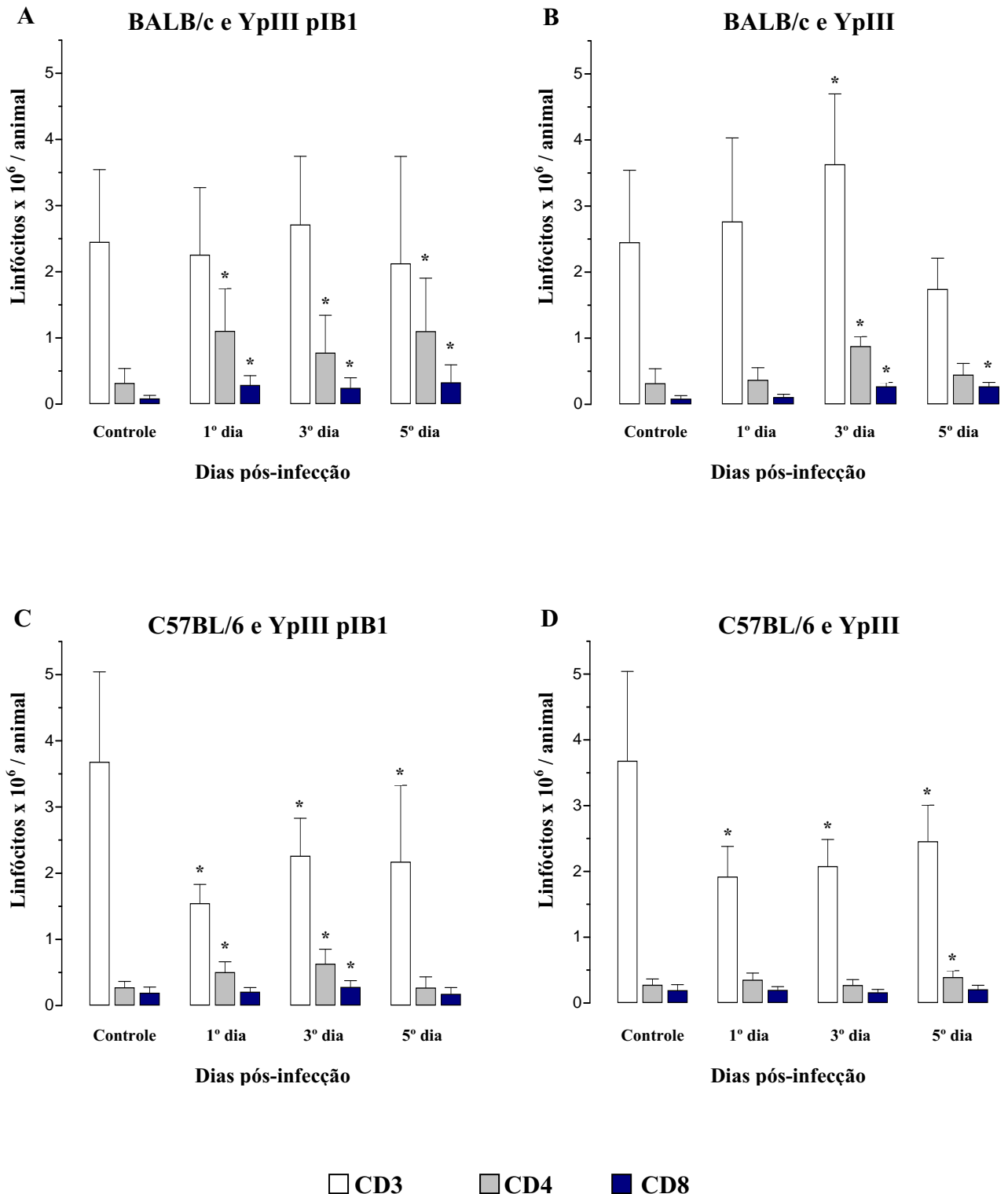
\* Indica diferença significativa do grupo infectado em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ )

$\emptyset$  Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD3 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

$\diamond$  Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD4 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

$\Delta$  Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD8 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

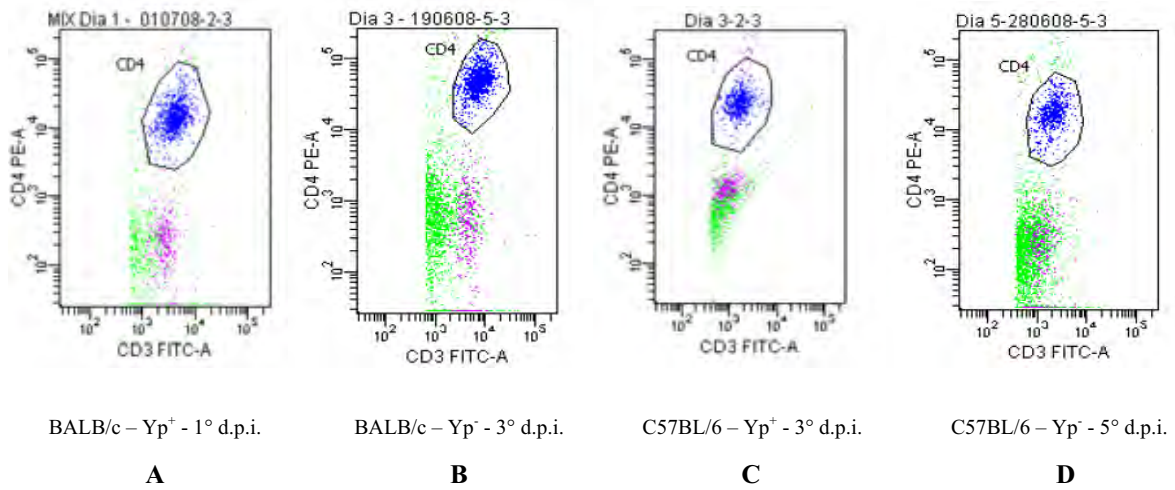
Obs: Os números à direita dos símbolos  $\emptyset$ ,  $\diamond$  e  $\Delta$  identificam os dois grupos de animais significativamente diferentes



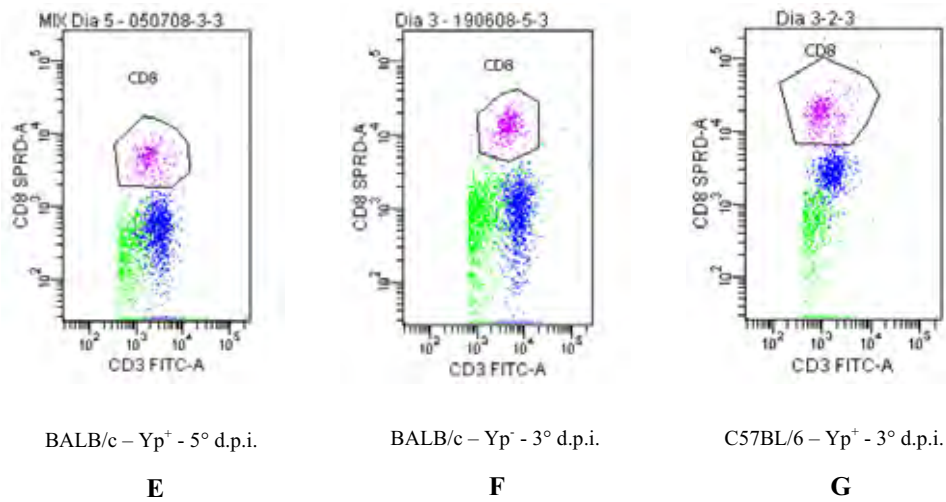
**Figura 10.** Quantificação dos linfócitos T (LT) e subpopulações, LT-CD4 e LT-CD8, durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII. Camundongos BALB/c (A e B) e C57BL/6 (C e D) foram sacrificados no 1º, 3º e 5º dias após a infecção e os LT das placas de Peyer e suas subpopulações quantificadas através de citometria de fluxo. Os resultados apresentados correspondem às médias e os desvios padrões do número absoluto de linfócitos (x 10<sup>6</sup>) por animal (n = 6 animais por dia). O símbolo \* indica diferença significativa (p < 0,05) entre os animais infectados e animais controles.



### LT-CD4



### LT-CD8



**Figura 11.** Principais alterações ocorridas no número de linfócitos T CD4 e CD8 durante as infecções com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis* em camundongos BALB/c e C57BL/6.

#### 4.6. Detecção das citocinas intracelulares IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ dos linfócitos das placas de Peyer

Os linfócitos obtidos das placas de Peyer dos animais infectados com as diferentes amostras bacterianas e dos animais não infectados (controles) foram analisados quanto à produção de citocinas intracelulares, em condições de estímulo *in vitro* com PMA e ionomicina e na ausência de estímulo. As quantificações das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram realizadas utilizando-se anticorpos específicos marcados com fluorocromos e as intensidades de fluorescência das mesmas foram determinadas por citometria de fluxo.

Os resultados descritos a seguir referem-se às medianas das intensidades de fluorescência (MIF) das respectivas citocinas produzidas pelos LT-CD4 e LT-CD8.

Em relação à produção de IL-2 pelos linfócitos foi verificado que, de uma maneira geral, camundongos C57BL/6 controles produziram maiores quantidades dessa citocina quando comparados aos camundongos BALB/c controles (Tabela 9).

As infecções por *Y. pseudotuberculosis* produziram um aumento na produção de IL-2 pelos LT-CD4 e LT-CD8 nos camundongos BALB/c, tanto na infecção pela amostra portadora de plasmídeo ( $Yp^+$ ) quanto pela amostra não portadora de plasmídeo ( $Yp^-$ ) (Tabela 9 e Figuras 12A, 12B, 12C e 12D). Os maiores aumentos foram observados para a amostra  $Yp^+$ . No grupo BALB/c ( $Yp^+$ ) foram verificados aumentos significativos em relação aos animais controles em todo o período da infecção, com o maior aumento ocorrendo no 1º dia p.i., tanto para os LT-CD4 quanto para os LT-CD8, em condições de estímulo (CE) e sem estímulo (SE) (1,4 vezes maior para o CD4-SE, 1,7 vezes maior para o CD4-CE, 1,7 vezes maior para o CD8-SE e 1,8 vezes maior para o CD8-CE) (Figuras 12A e 12C). No grupo BALB/c ( $Yp^-$ ) não ocorreram aumentos significativos para os LT-CD4 e LT-CD8 sem estímulos. Aumentos significativos foram observados para os LT-CD4-CE, com um pico de produção no 3º dia p.i. (1,1 vezes maior) e para os LT-CD8-CE, com aumento significativo no 5º dia p.i. (1,4 vezes maior) (Figuras 12B e 12D).

Para os grupos de animais C57BL/6, as infecções por *Y. pseudotuberculosis* resultaram na diminuição da produção de IL-2 pelos linfócitos CD4 e CD8 em ambas as situações (Tabela 9 e Figuras 12A, 12B, 12C e 12D). A produção desta citocina oscilou, aumentando e diminuindo, mas os valores significativos sempre foram observados em dias em que a produção foi reduzida (Tabela 9 e Figuras 12B e 12C). No grupo C57BL/6 ( $Yp^+$ ), não foram verificadas reduções significativas na produção de IL-2 pelos linfócitos CD4-SE e CD4-CE. Para os linfócitos CD8-SE essas reduções ocorreram no 5º dia (1,3 vezes menor) e para os linfócitos CD8-CE no 3º dia (1,3 vezes menor) (Tabela 9 e Figuras 12A e 12C). No

grupo C57BL/6 ( $Y^p$ ) não foram observadas reduções significativas da produção da citocina para os linfócitos CD4-SE, CD8-SE e CD8-CE. Para os linfócitos CD4-CE essa redução foi significativa no 5º dia p.i. (1,1 vezes menor) (Tabela 9 e Figuras 12B e 12D).

A figura 13 apresenta os histogramas das principais alterações ocorridas na produção de IL-2 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer.

**Tabela 9** - Detecção intracelular da citocina IL-2 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência  $\pm$  desvio padrão de 6 animais para cada dia, em condição de estímulo com PMA e Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE)

Amostra	Animal	Linfócito	Estímulo	Dias pós-infecção			Controle
				1º Dia	3º Dia	5º Dia	
YpIII pIB1	Balb/c	CD4	SE	1650 $\pm$ 550*	1324 $\pm$ 125*	1404 $\pm$ 213*	1172 $\pm$ 97
			CE	1946 $\pm$ 968* <sup>◆1</sup>	1227 $\pm$ 51*	1273 $\pm$ 56*	1170 $\pm$ 40
		CD8	SE	3049 $\pm$ 1023*	2610 $\pm$ 512*	2398 $\pm$ 418* <sup>■1</sup>	1772 $\pm$ 305
			CE	2944 $\pm$ 581*	2523 $\pm$ 613* <sup>■1</sup>	2538 $\pm$ 380*	1614 $\pm$ 302
	C57BL/6	CD4	SE	1325 $\pm$ 229	1267 $\pm$ 126	1270 $\pm$ 61	1327 $\pm$ 99
			CE	1269 $\pm$ 188 <sup>◆1</sup>	1325 $\pm$ 185	1641 $\pm$ 579	1334 $\pm$ 95
		CD8	SE	2319 $\pm$ 686	2320 $\pm$ 389 <sup>Δ</sup>	1882 $\pm$ 368* <sup>■1</sup>	2515 $\pm$ 641
			CE	2538 $\pm$ 834	1721 $\pm$ 225* <sup>■1Δ</sup>	1987 $\pm$ 266	2187 $\pm$ 417
YpIII	Balb/c	CD4	SE	1204 $\pm$ 62	1246 $\pm$ 36	1267 $\pm$ 41	1172 $\pm$ 97
			CE	1248 $\pm$ 36*	1306 $\pm$ 59* <sup>◆4</sup>	1279 $\pm$ 92*	1170 $\pm$ 40
		CD8	SE	2206 $\pm$ 994	1708 $\pm$ 102 <sup>■2</sup>	2003 $\pm$ 431	1772 $\pm$ 305
			CE	1591 $\pm$ 75 <sup>■2</sup>	1701 $\pm$ 135 <sup>■3</sup>	2308 $\pm$ 437*	1614 $\pm$ 302
	C57BL/6	CD4	SE	1268 $\pm$ 55	1276 $\pm$ 38	1279 $\pm$ 51	1327 $\pm$ 99
			CE	1250 $\pm$ 54	1255 $\pm$ 34 <sup>◆4</sup>	1226 $\pm$ 33*	1334 $\pm$ 95
		CD8	SE	2019 $\pm$ 249	2964 $\pm$ 325 <sup>■2Δ</sup>	2387 $\pm$ 382	2515 $\pm$ 641
			CE	1965 $\pm$ 293 <sup>■2</sup>	2299 $\pm$ 490 <sup>■3Δ</sup>	2321 $\pm$ 591	2187 $\pm$ 417

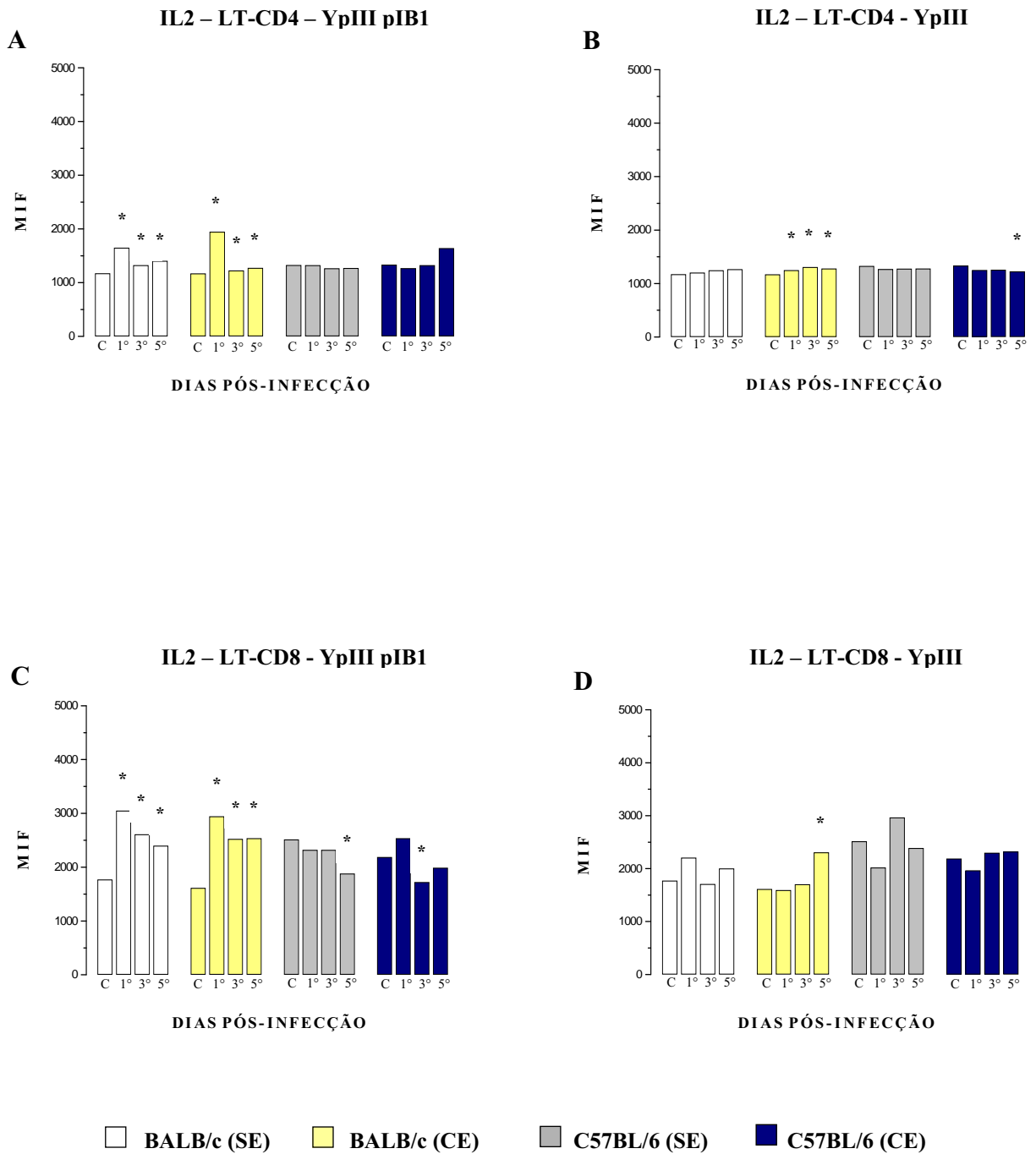
\* Indica diferença significativa do grupo infectado em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ )

◆ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD4 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

■ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD8 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

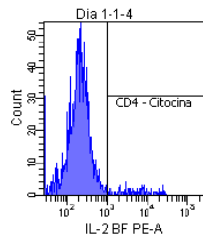
Δ Indica diferença significativa das condições de estímulo e sem estímulo entre os animais de um mesmo grupo ( $p < 0,05$ )

Obs: Os números à direita dos símbolos ◆, ■ e Δ identificam os dois grupos de animais significativamente diferentes

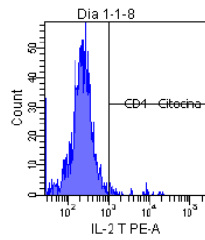


**Figura 12.** Cinética da produção de citocina IL-2 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE) (n = 6 animais por dia). A letra C corresponde à média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento e os números 1°, 3° e 5° correspondem aos dias pós-infecção. O símbolo \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os animais infectados e animais controles.

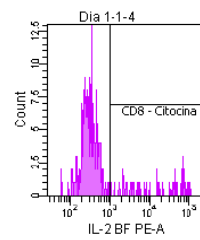
### BALB/c – YpIII pIB1



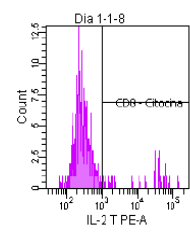
CD4-SE - 1° d.p.i



CD4-CE - 1° d.p.i

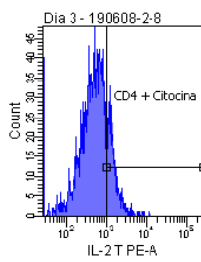


CD8-SE - 1° d.p.i

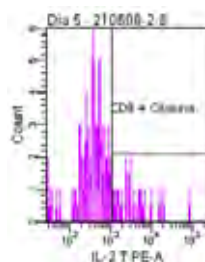


CD8-CE - 1° d.p.i

### BALB/c – YpIII

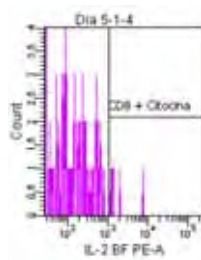


CD4-CE - 3° d.p.i

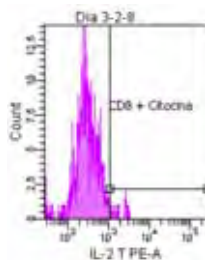


CD8-CE - 5° d.p.i

### C57BL/6 – YpIII pIB1

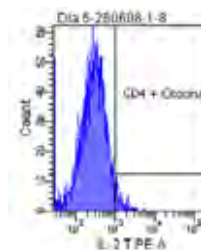


CD8-SE - 5° d.p.i



CD8-CE - 3° d.p.i

### C57BL/6 – YpIII



CD4-CE - 5° d.p.i

**Figura 13.** Principais alterações da produção de IL-2 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

O perfil de produção de IL-4 apresentou-se semelhante ao observado para IL-2. Camundongos C57BL/6 controles apresentaram uma produção maior de IL-4 em relação aos BALB/c controles (Tabela 10 e Figuras 14A, 14B, 14C e 14D). Entretanto, as infecções por *Y. pseudotuberculosis* desencadearam um aumento na produção de IL-4 pelos linfócitos CD4 e CD8, nas condições de estímulo e sem estímulo, e para as duas amostras bacterianas nos camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6 desencadearam uma redução na produção da citocina, também nas mesmas situações (Tabela 10 e Figuras 14A, 14B, 14C e 14D).

No grupo BALB/c ( $Yp^+$ ) foram observados aumentos em todo o período de infecção analisado. A produção de IL-4 pelos linfócitos CD4-SE foi significativa no 1º dia (1,3 vezes maior em relação aos animais controles). Os linfócitos CD4-CE produziram quantidades significativamente aumentadas no 1º e no 5º dia, com o maior aumento observado no 1º dia p.i. (2,5 vezes maior). Os linfócitos CD8, em situação de estímulo e sem estímulo, produziram quantidades significativamente aumentadas no 1º dia p.i. (1,9 vezes maior para o CD8-SE e 1,7 vezes maior para o CD8-CE) (Tabela 10 e Figuras 14A e 14C).

O grupo BALB/c ( $Yp^-$ ) também apresentou um aumento na produção de IL-4. Linfócitos CD4-SE apresentaram aumento significativo na produção da citocina no 5º dia (1,1 vezes maior). Os linfócitos CD4-CE apresentaram aumentos significativos no 3º e 5º dias, com um maior aumento no 3º dia p.i. (1,1 vezes maior). Os linfócitos CD8 apresentaram aumentos na produção da citocina em todo o período, mas apenas os linfócitos CD8-SE apresentaram aumento significativo (5º dia com produção 1,2 vezes maior) (Tabela 10 e Figuras 14B e 14D).

Os dois grupos de camundongos C57BL/6 ( $Yp^+$  e  $Yp^-$ ) tiveram uma redução na produção de IL-4 pelos linfócitos CD4 e CD8. No grupo C57BL/6 ( $Yp^+$ ), a produção de IL-4 pelos linfócitos CD4-SE diminuiu em todo o período e foram significativas no 1º e no 5º dias (maior redução no 5º dia, 1,1 vezes menor). Nos linfócitos CD4-CE, a redução significativa na produção ocorreu no 5º dia (1,05 vezes menor), nos linfócitos CD8-SE ocorreu no 1º dia (1,3 vezes menor) e nos linfócitos CD8-CE a redução não foi significativa durante o período analisado (Tabela 10 e Figuras 14A e 14C). No grupo C57BL/6 ( $Yp^-$ ), os linfócitos CD4-SE e CD4-CE apresentaram redução significativa na produção da citocina durante todo o período analisado (valores 1,04 vezes menor em todo o período para os linfócitos CD4-SE e maior redução no 5º dia para os linfócitos CD4-CE, com valor 1,1 vezes menor). Os linfócitos CD8 apresentaram redução em todo o período, mas que não foram significativas (Tabela 10 e Figuras 14B e 14D).

A figura 15 apresenta os histogramas das principais alterações ocorridas na produção de IL-4 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer.

**Tabela 10** - Detecção intracelular da citocina IL-4 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência  $\pm$  desvio padrão de 6 animais para cada dia, em condição de estímulo com PMA e Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE)

Amostra	Animal	Linfócito	Estímulo	Dias pós-infecção			Controle
				1º Dia	3º Dia	5º Dia	
YpIII pIB1	Balb/c	CD4	SE	1591 $\pm$ 638*	1259 $\pm$ 114	1242 $\pm$ 106	1181 $\pm$ 65
			CE	2898 $\pm$ 1748*	1176 $\pm$ 60	1272 $\pm$ 48*	1172 $\pm$ 50
		CD8	SE	3048 $\pm$ 1544*	2752 $\pm$ 899*	2560 $\pm$ 431*	1638 $\pm$ 150
			CE	2843 $\pm$ 1107*	2343 $\pm$ 579* <sup>■1</sup>	2312 $\pm$ 383*	1707 $\pm$ 321
	C57BL/6	CD4	SE	1222 $\pm$ 107*	1295 $\pm$ 190	1215 $\pm$ 97*	1331 $\pm$ 75
			CE	1310 $\pm$ 150	1235 $\pm$ 133	1221 $\pm$ 47*	1289 $\pm$ 65
		CD8	SE	1755 $\pm$ 172*	2140 $\pm$ 465	2202 $\pm$ 527	2306 $\pm$ 605
			CE	2021 $\pm$ 321	1845 $\pm$ 239 <sup>■1</sup>	2172 $\pm$ 484	2224 $\pm$ 741
YpIII	Balb/c	CD4	SE	1195 $\pm$ 46* <sup>◆1</sup>	1251 $\pm$ 78	1328 $\pm$ 144*	1181 $\pm$ 65
			CE	1167 $\pm$ 69	1276 $\pm$ 49*	1249 $\pm$ 51*	1172 $\pm$ 50
		CD8	SE	1930 $\pm$ 681	1773 $\pm$ 193 <sup>■2</sup>	1909 $\pm$ 283*	1638 $\pm$ 150
			CE	1908 $\pm$ 418	1716 $\pm$ 195	2482 $\pm$ 935	1707 $\pm$ 321
	C57BL/6	CD4	SE	1280 $\pm$ 62* <sup>◆1</sup>	1277 $\pm$ 39*	1277 $\pm$ 46* <sup>Δ</sup>	1331 $\pm$ 75
			CE	1224 $\pm$ 28*	1238 $\pm$ 23*	1213 $\pm$ 52* <sup>Δ</sup>	1289 $\pm$ 65
		CD8	SE	2086 $\pm$ 354	2756 $\pm$ 370 <sup>■2Δ</sup>	2486 $\pm$ 447	2306 $\pm$ 605
			CE	2073 $\pm$ 689	2065 $\pm$ 775 <sup>Δ</sup>	2157 $\pm$ 520	2224 $\pm$ 741

\* Indica diferença significativa do grupo infectado em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ )

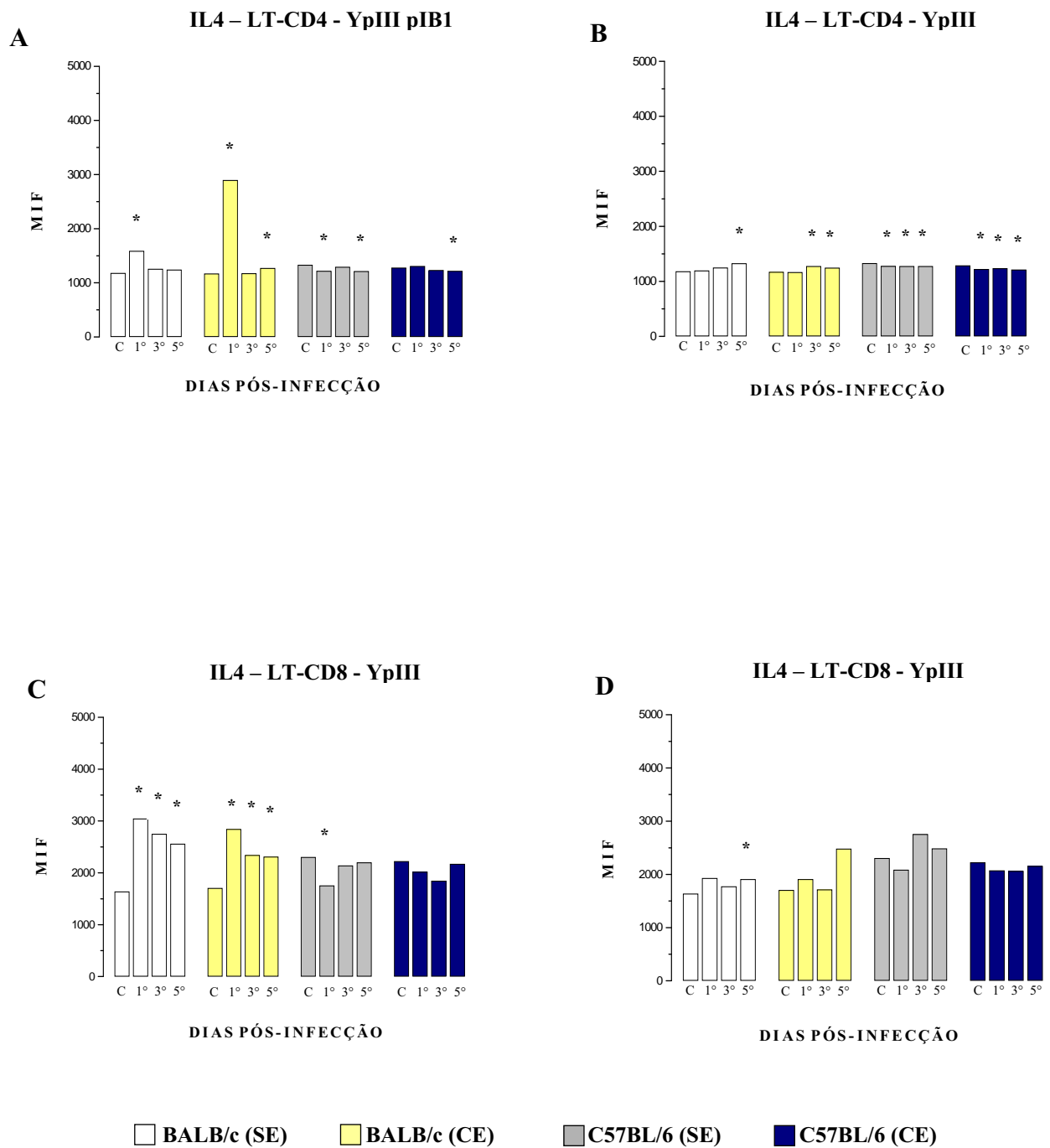
◆ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD4 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

■ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD8 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

Δ Indica diferença significativa das condições de estímulo e sem estímulo entre os animais de um mesmo grupo ( $p < 0,05$ )

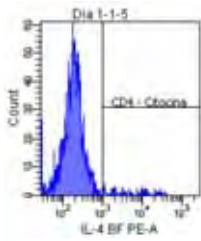
Obs: Os números à direita dos símbolos ◆, ■ e Δ identificam os dois grupos de animais significativamente diferentes



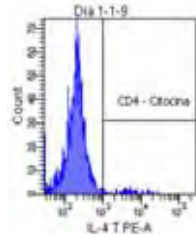


**Figura 14.** Cinética da produção de citocina IL-4 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE) (n = 6 animais por dia). A letra C corresponde à média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento e os números 1°, 3° e 5° correspondem aos dias pós-infecção. O símbolo \* indica diferença significativa (p < 0,05) entre os animais infectados e animais controles.

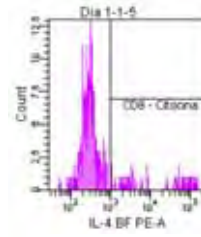
### BALB/c – YpIII pIB1



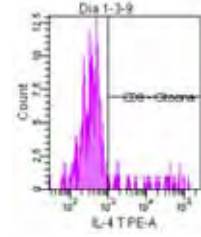
CD4-SE - 1° d.p.i



CD4-CE - 1° d.p.i

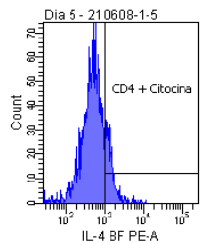


CD8-SE - 1° d.p.i

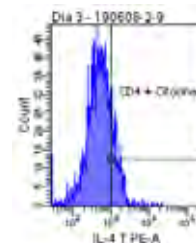


CD8-CE - 1° d.p.i

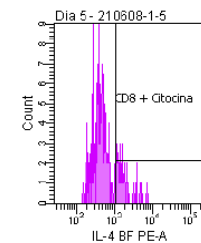
### BALB/c – YpIII



CD4-SE - 5° d.p.i

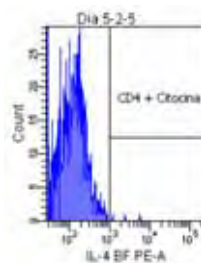


CD4-CE - 3° d.p.i

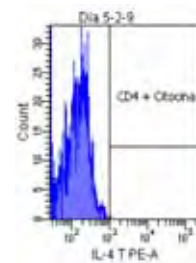


CD8-SE - 5° d.p.i

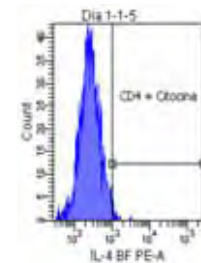
### C57BL/6 – YpIII pIB1



CD4-SE - 5° d.p.i

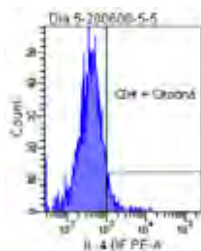


CD4-CE - 5° d.p.i

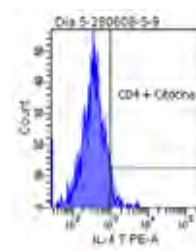


CD8-SE - 1° d.p.i

### C57BL/6 – YpIII



CD4-SE - 5° d.p.i



CD4-CE - 5° d.p.i

**Figura 15.** Principais alterações da produção de IL-4 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

A produção de IL-10 também aumentou nos grupos de camundongos BALB/c e reduziu nos grupos C57BL/6, mesmo sendo observada uma produção maior dessa citocina nos animais C57BL/6 controles (Tabela 11 e Figuras 16A, 16B, 16C e 16D).

Os linfócitos CD4-SE dos camundongos BALB/c infectados com a amostra portadora de plasmídeo ( $Yp^+$ ) apresentaram aumentos na produção desta citocina durante todo o período analisado, mas que não se mostraram significativos. Os linfócitos CD4-CE e CD8-SE tiveram aumentos significativos em todo o período, com um maior aumento observado no 1º dia p.i. (2,6 vezes maior para os LT-CD4-CE e 1,7 vezes maior para os LT-CD8-SE). Os linfócitos CD8-CE apresentaram aumentos em todo o período e que foram significativos no 1º e no 5º dia (aumento maior no 1º dia, de 1,7 vezes) (Tabela 11 e Figuras 16A e 16C).

O grupo BALB/c ( $Yp^-$ ) também apresentou aumento na produção de IL-10 pelos linfócitos, mas que se mostrou menor em relação ao mesmo grupo de animais infectados por  $Yp^+$ . A produção da citocina pelos linfócitos CD4-SE apresentou aumento significativo no 3º dia (1,1 vezes maior). Os linfócitos CD4-CE mostraram aumentos significativos na produção da citocina em todo o período estudado, com um maior aumento ocorrido no 5º dia p.i. (1,1 vezes maior). Os linfócitos CD8-SE apresentaram aumentos significativos na produção de IL-10 no 3º dia (1,2 vezes maior) e os linfócitos CD8-CE apresentaram aumentos significativos no 3º e 5º dias, 1,2 vezes maiores em relação à produção verificada nos animais controles (Tabela 11 e Figuras 16B e 16D).

Camundongos C57BL/6 apresentaram redução na produção de IL-10, aparentemente não mostrando diferenças quanto às reduções ocorridas entre as duas amostras bacterianas estudadas. Linfócitos CD4-SE e CD4-CE do grupo C57BL/6 ( $Yp^+$ ) apresentaram reduções significativas na produção da citocina no 1º e no 3º dia p.i., respectivamente, com valores 1,1 vezes menores. Os linfócitos CD8-SE e CD8-CE desse grupo não apresentaram reduções significativas nas produções dessa citocina (Tabela 11 e Figuras 16A e 16C). O grupo C57BL/6 ( $Yp^-$ ) apresentou, de modo geral, uma redução na produção de IL-10 em todos os linfócitos analisados, mas que foi significativa apenas para os linfócitos CD4-SE no 3º e no 5º dia p.i. (1,1 vezes menores) (Tabela 11 e Figuras 16B e 16D).

A figura 17 apresenta os histogramas das principais alterações ocorridas na produção de IL-10 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer.

**Tabela 11** - Detecção intracelular da citocina IL-10 nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência  $\pm$  desvio padrão de 6 animais para cada dia, em condição de estímulo com PMA e Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE)

Amostra	Animal	Linfócito	Estímulo	Dias pós-infecção			Controle
				1º Dia	3º Dia	5º Dia	
YpIII pIB1	Balb/c	CD4	SE	2217 $\pm$ 1431	1233 $\pm$ 44	1295 $\pm$ 162	1187 $\pm$ 66
			CE	3033 $\pm$ 2649*	1216 $\pm$ 60*	1237 $\pm$ 82*	1149 $\pm$ 33
		CD8	SE	2550 $\pm$ 1292*	2412 $\pm$ 877*	1954 $\pm$ 353*	1503 $\pm$ 151
			CE	2501 $\pm$ 572* <sup>■1</sup>	2277 $\pm$ 985	1794 $\pm$ 414*	1456 $\pm$ 113
	C57BL/6	CD4	SE	1262 $\pm$ 124*	1275 $\pm$ 56	1330 $\pm$ 217	1364 $\pm$ 109
			CE	1259 $\pm$ 164	1211 $\pm$ 54*	1281 $\pm$ 218	1313 $\pm$ 135
		CD8	SE	1758 $\pm$ 259	2453 $\pm$ 999	2120 $\pm$ 672	2123 $\pm$ 540
			CE	1871 $\pm$ 245 <sup>■1</sup>	2102 $\pm$ 452	1882 $\pm$ 377	2062 $\pm$ 395
YpIII	Balb/c	CD4	SE	1225 $\pm$ 65	1263 $\pm$ 58*	1183 $\pm$ 62	1187 $\pm$ 66
			CE	1220 $\pm$ 20*	1237 $\pm$ 47*	1249 $\pm$ 81*	1149 $\pm$ 33
		CD8	SE	1627 $\pm$ 158 <sup>■2</sup>	1757 $\pm$ 200*	1472 $\pm$ 91 <sup>■1</sup>	1503 $\pm$ 151
			CE	1677 $\pm$ 169* <sup>■3</sup>	1562 $\pm$ 146	1756 $\pm$ 356*	1456 $\pm$ 113
	C57BL/6	CD4	SE	1271 $\pm$ 48 <sup>Δ</sup>	1262 $\pm$ 33* <sup>Δ</sup>	1249 $\pm$ 39*	1364 $\pm$ 109
			CE	1206 $\pm$ 20 <sup>Δ</sup>	1220 $\pm$ 34 <sup>Δ</sup>	1225 $\pm$ 18	1313 $\pm$ 135
		CD8	SE	1887 $\pm$ 152 <sup>■2Δ</sup>	2307 $\pm$ 597	1951 $\pm$ 318 <sup>■1</sup>	2123 $\pm$ 540
			CE	1612 $\pm$ 296 <sup>■3Δ</sup>	1843 $\pm$ 286	1763 $\pm$ 254	2062 $\pm$ 395

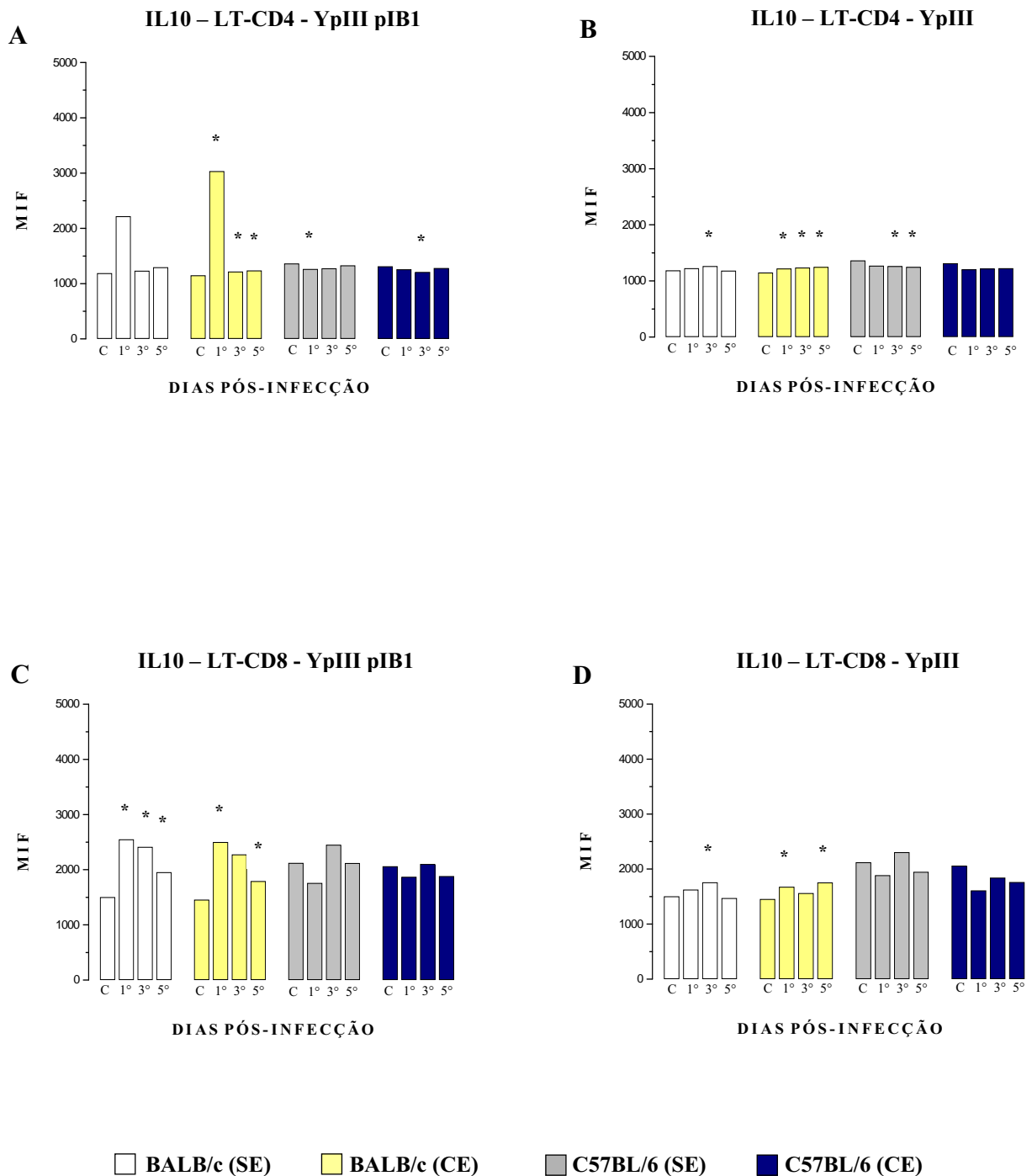
\* Indica diferença significativa do grupo infectado em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ )

◆ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD4 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

■ Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD8 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

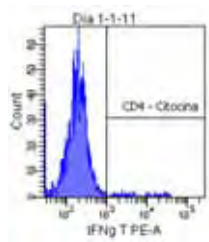
Δ Indica diferença significativa das condições de estímulo e sem estímulo entre os animais de um mesmo grupo ( $p < 0,05$ )

Obs: Os números à direita dos símbolos ◆, ■ e Δ identificam os dois grupos de animais significativamente diferentes

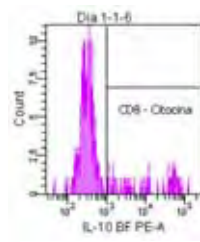


**Figura 16.** Cinética da produção de citocina IL-10 pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE) (n = 6 animais por dia). A letra C corresponde à média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento e os números 1°, 3° e 5° correspondem aos dias pós-infecção. O símbolo \* indica diferença significativa (p < 0,05) entre os animais infectados e animais controles.

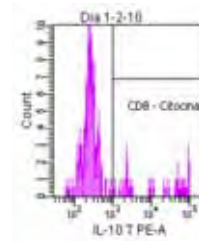
### BALB/c – YpIII pIB1



CD4-CE - 1° d.p.i

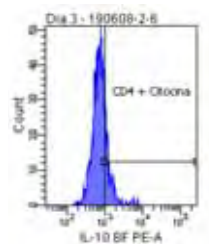


CD8-SE - 1° d.p.i

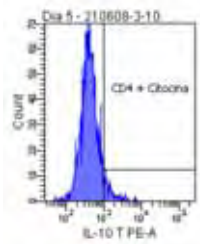


CD8-CE - 1° d.p.i

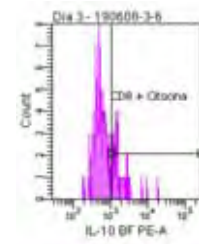
### BALB/c – YpIII



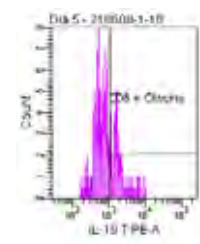
CD4-SE - 3° d.p.i



CD4-CE - 5° d.p.i

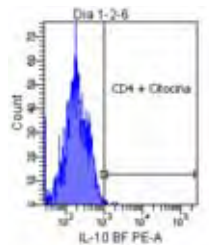


CD8-SE - 3° d.p.i

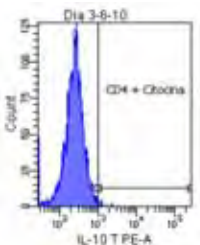


CD8-CE - 5° d.p.i

### C57BL/6 – YpIII pIB1

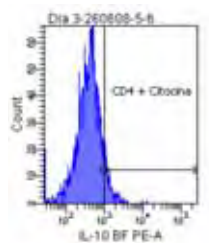


CD4-SE - 1° d.p.i



CD4-CE - 3° d.p.i

### C57BL/6 – YpIII



CD4-SE - 5° d.p.i

**Figura 17.** Principais alterações da produção de IL-10 pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

Em relação à produção da citocina IFN- $\gamma$ , verificou-se que os linfócitos de camundongos C57BL/6 controles produziram maiores quantidades dessa citocina, principalmente os linfócitos T-CD8 (Tabela 12).

De maneira geral, os animais BALB/c infectados apresentaram um aumento na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, principalmente pelos linfócitos T-CD8 e para a amostra bacteriana Yp<sup>+</sup> (Tabela 12 e Figuras 18A e 18C).

Os animais C57BL/6 apresentaram comportamentos diferentes quanto às produções de IFN- $\gamma$  apresentadas pelos linfócitos T-CD4 e CD8, geralmente reduzindo as produções da referida citocina.

O grupo de animais BALB/c (Yp<sup>+</sup>) apresentou aumentos significativos na produção de IFN- $\gamma$  no 1º e no 3º dia para os linfócitos CD4-SE e CD8-CE, com os maiores aumentos observados no 1º dia p.i. (1,8 vezes e 2,3 vezes, respectivamente). Nos linfócitos CD4-CE, os aumentos foram significativos no 1º e no 5º dia (maior aumento no 1º dia, 2,4 vezes maior em relação aos animais controles); e nos linfócitos CD8-SE em todo o período analisado (maior aumento no 1º dia, 1,7 vezes maior) (Tabela 12 e Figuras 18A e 18C).

Camundongos BALB/c (Yp<sup>-</sup>) apresentaram aumentos na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T-CD4. Nos linfócitos CD4-SE esse aumento foi significativo no 5º dia (1,1 vezes maior) e nos linfócitos CD4-CE foi significativo em todo o período analisado, com o maior aumento observado no 3º dia (1,1 vezes maior). A produção da citocina pelos linfócitos T-CD8 aumentou em todo o período analisado, mas não foi significativa (Tabela 12 e Figuras 18B e 18D).

Os linfócitos CD4-SE do grupo de animais C57BL/6 (Yp<sup>+</sup>) apresentaram aumentos na produção da citocina no 1º e no 5º dia p.i., mas que não foram significativos. O mesmo ocorreu para os linfócitos CD4-CE no 1º e no 3º dia p.i. Os linfócitos CD8-SE apresentaram uma redução significativa no 1º dia p.i. (1,3 vezes menor) e os linfócitos CD8-CE apresentaram reduções na produção de IFN- $\gamma$  em todo o período, mas que não se mostraram significativas (Tabela 12 e Figuras 18A e 18C).

Camundongos do grupo C57BL/6 (Yp<sup>-</sup>) apresentaram, de modo geral, uma redução na produção desta citocina, tanto pelos linfócitos T-CD4 quanto para os CD8. Apenas a produção pelos linfócitos T-CD8-SE se mostrou diferente das demais, apresentando aumento significativo na produção dessa citocina no 3º dia (1,3 vezes maior que a produção dos animais controles), mas que reduziu no final do período analisado. Os linfócitos T-CD8-CE apresentaram uma redução desta citocina em todo o período e que foi significativa no 1º dia (1,3 vezes menor). Os linfócitos CD4-SE apresentaram reduções na produção de IFN- $\gamma$  que

foram significativas no 1º e no 5º dia (1,1 vezes menores) e os linfócitos CD4-CE apresentaram reduções em todo o período e que foram significativas no 1º dia p.i. (1,05 vezes menor) (Tabela 12 e Figuras 18B e 18D).

A figura 19 apresenta os histogramas das principais alterações ocorridas na produção de IFN- $\gamma$  pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer.



**Tabela 12** - Detecção intracelular da citocina IFN- $\gamma$  nos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as diferentes amostras de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados mostrados representam os valores médios das medianas das intensidades de fluorescência  $\pm$  desvio padrão de 6 animais para cada dia, em condição de estímulo com PMA e Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE)

Amostra	Animal	Linfócito	Estímulo	Dias pós-infecção			Controle
				1º Dia	3º Dia	5º Dia	
YpIII pIB1	Balb/c	CD4	SE	2172 $\pm$ 1091*	1305 $\pm$ 173*	1309 $\pm$ 166	1176 $\pm$ 63
			CE	2826 $\pm$ 2008* $\blacklozenge^1$	1232 $\pm$ 89	1280 $\pm$ 68*	1157 $\pm$ 64
		CD8	SE	2828 $\pm$ 1023* $\blacksquare^2$	2252 $\pm$ 264*	2725 $\pm$ 1080*	1637 $\pm$ 256
			CE	4231 $\pm$ 2655* $\blacksquare^3$	2593 $\pm$ 543* $\blacksquare^1$	2462 $\pm$ 579	1837 $\pm$ 483
	C57BL/6	CD4	SE	1445 $\pm$ 262	1319 $\pm$ 197	1363 $\pm$ 243	1335 $\pm$ 81
			CE	1298 $\pm$ 269 $\blacklozenge^1$	1296 $\pm$ 164	1209 $\pm$ 142	1291 $\pm$ 51
		CD8	SE	1949 $\pm$ 444* $\blacksquare^2$	2125 $\pm$ 479	2063 $\pm$ 372	2495 $\pm$ 505
			CE	1938 $\pm$ 189 $\blacksquare^3$	1900 $\pm$ 362 $\blacksquare^1$	1927 $\pm$ 423	2232 $\pm$ 608
YpIII	Balb/c	CD4	SE	1210 $\pm$ 82	1239 $\pm$ 81	1288 $\pm$ 125*	1176 $\pm$ 63
			CE	1228 $\pm$ 41*	1280 $\pm$ 57*	1267 $\pm$ 38*	1157 $\pm$ 64
		CD8	SE	1719 $\pm$ 243	1729 $\pm$ 221 $\blacksquare^2$	2110 $\pm$ 555	1637 $\pm$ 256
			CE	2064 $\pm$ 765	1861 $\pm$ 185	2069 $\pm$ 258	1837 $\pm$ 483
	C57BL/6	CD4	SE	1266 $\pm$ 34*	1275 $\pm$ 45	1256 $\pm$ 31*	1335 $\pm$ 81
			CE	1227 $\pm$ 26*	1261 $\pm$ 48	1261 $\pm$ 41	1291 $\pm$ 51
		CD8	SE	1861 $\pm$ 293*	3165 $\pm$ 718* $\blacksquare^2\Delta$	2221 $\pm$ 175	2495 $\pm$ 505
			CE	2090 $\pm$ 223*	2151 $\pm$ 382 $\Delta$	2012 $\pm$ 317	2232 $\pm$ 608

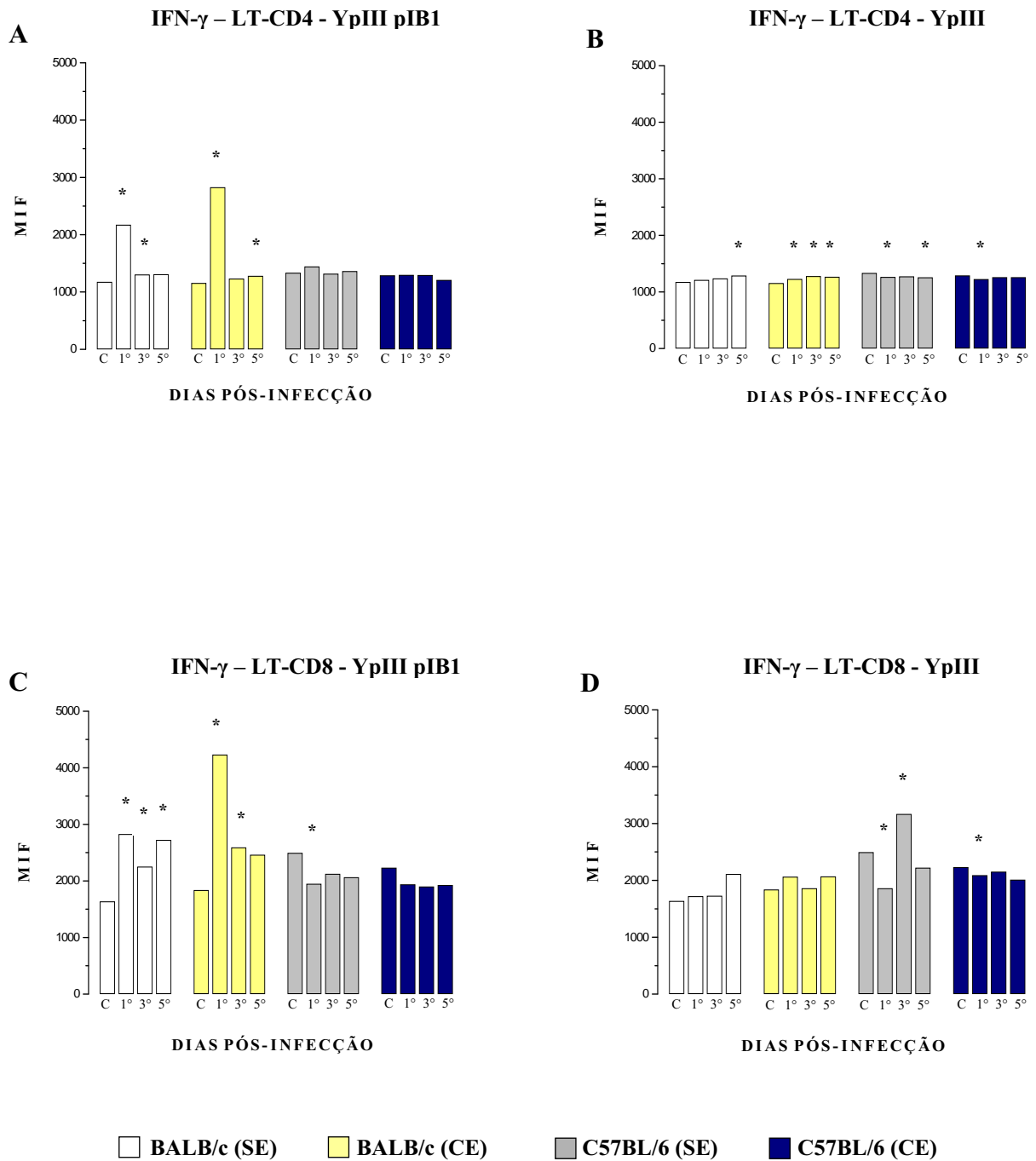
\* Indica diferença significativa do grupo infectado em relação ao seu grupo controle ( $p < 0,05$ )

$\blacklozenge$  Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD4 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

$\blacksquare$  Indica diferença significativa das populações linfocitárias CD8 entre os grupos de animais analisados no mesmo tempo de experimentação ( $p < 0,05$ )

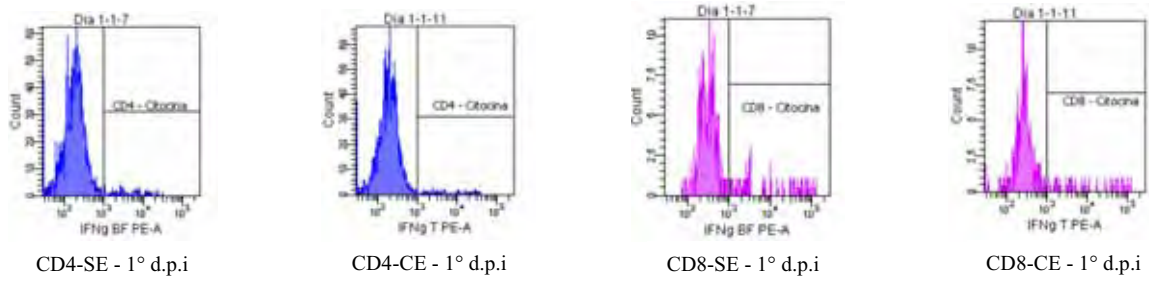
$\Delta$  Indica diferença significativa das condições de estímulo e sem estímulo entre os animais de um mesmo grupo ( $p < 0,05$ )

Obs: Os números à direita dos símbolos  $\blacklozenge$ ,  $\blacksquare$  e  $\Delta$  identificam os dois grupos de animais significativamente diferentes

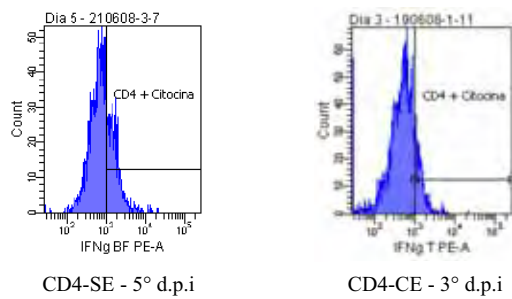


**Figura 18.** Cinética da produção de citocina IFN- $\gamma$  pelos LT-CD4 (A e B) e CD8 (C e D) das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*. Os resultados apresentados referem-se aos valores médios das medianas das intensidades de fluorescência (MIF) obtidas com os linfócitos estimulados em cultura com PMA + Ionomicina (CE) e sem estímulo (SE) (n = 6 animais por dia). A letra C corresponde à média dos valores obtidos com os animais controles durante todo o experimento e os números 1°, 3° e 5° correspondem aos dias pós-infecção. O símbolo \* indica diferença significativa (p < 0,05) entre os animais infectados e animais controles.

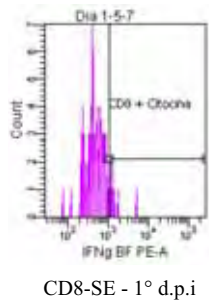
### BALB/c – YpIII pIB1



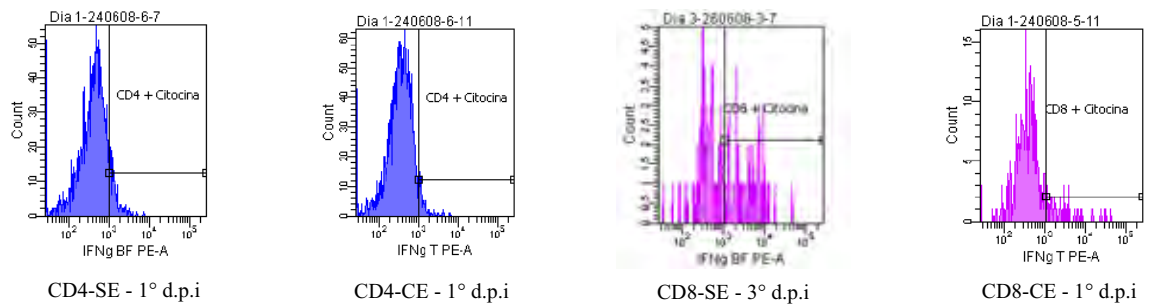
### BALB/c – YpIII



### C57BL/6 – YpIII pIB1



### C57BL/6 – YpIII



**Figura 19.** Principais alterações da produção de IFN- $\gamma$  pelos LT-CD4 e CD8 das placas de Peyer de camundongos BALB/c e C57BL/6 após infecção intragástrica com as amostras YpIII pIB1 e YpIII de *Y. pseudotuberculosis*.

## 5. DISCUSSÃO

A eficiência dos mecanismos de defesa contra os diferentes tipos de microrganismos que invadem nosso organismo requer tipos especializados de respostas imunes inatas e adaptativas. Estas respostas são dirigidas pelo desenvolvimento de sub-populações de células T CD4<sup>+</sup> específicas ao patógeno. Células T *helper* 1 (Th1) e Th2 ativam diferentes componentes da imunidade celular e humoral. A imunidade à invasão microbiana mediada por células Th1/Th2 é controlada por células T reguladoras, definida recentemente como uma classe diversa de células T, reguladoras naturais ou adaptativas (BLUESTONE e ABBAS, 2003), que previnem autoimunidade e destruição tecidual letal provocada por respostas imunes inatas ou adaptativas crônicas, ao mesmo tempo, também asseguram o desenvolvimento de uma forte memória imunológica por retardar a erradicação do patógeno. Um melhor entendimento do papel das células dendríticas na polarização de células Th é de suma importância para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes para combater doenças infecciosas e câncer (que requerem mobilização aumentada de células Th1), assim como autoimunidade e alergia (que requerem a atividade de células T reguladoras). Neste trabalho investigamos a maneira pela qual as células dendríticas podem modificar e adaptar a resposta de células T à bactéria *Y. pseudotuberculosis*.

No intestino dos camundongos, as placas de Peyer representam o sítio primário de captura e apresentação de antígenos. Após o transporte através das células M, os antígenos são processados pelas células dendríticas, consideradas as células apresentadoras de antígenos mais potentes (BANCHEREAU et al., 1998). Devido à sua escassez (RUEDL et al., 1996) e número limitado de células nos tecidos ( $\geq 10^6$  células por PP), o isolamento das DCs de PP permanece um desafio. Além disso, as propriedades e funções destas células diferem daquelas isoladas de baço ou pele (REY et al., 2004; IWAZAKI e KELSALL, 1999). Do mesmo modo, DCs derivadas de medula óssea (INABA et al., 1992) podem não exibir todas as características e funções das DCs de PP. Além disso, o estado de diferenciação e ativação pode não refletir a natureza intrínseca das DCs isoladas do seu contexto natural.

Em vista disto, neste trabalho as DCs foram purificadas das PP dos camundongos através de uma técnica que utiliza pérolas magnéticas adsorvidas a um anticorpo anti-CD11c de camundongo. O número de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) observado nos animais controles da linhagem C57BL/6 foi 3,5 vezes maior em relação aos animais controles BALB/c. A infecção dos camundongos C57BL/6 com ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* provocou uma diminuição no número de DCs. Nos animais BALB/c infectados com a

amostra virulenta foi observada uma diminuição no número de DCs no 1º dia p.i. Já no grupo infectado com a amostra avirulenta foi observado um aumento no número de DCs em todos os dias p.i.

Estudos realizados *in vitro* por Erfuth et al. (2004) demonstraram que YopP de *Y. enterocolitica* diminui a resposta imune do hospedeiro através da indução de morte celular de DCs. Estudos prévios já haviam demonstrado que *Y. enterocolitica* induz apoptose em macrófagos murinos (DENECKER et al., 2001; RUCKDESCHEL et al., 1997) mas não em DCs humanas (SCHOPPET et al., 2000). Nossos resultados obtidos com a linhagem suscetível de camundongos estão de acordo com os resultados de Erfuth et al. (2004), uma vez que apenas a amostra que contém o plasmídeo de virulência provocou uma diminuição no número de DCs no 1º dia p.i., provavelmente devido à apoptose destas células. Já na linhagem resistente observamos uma diminuição no número de DCs em todo o período da infecção e mesmo com a amostra avirulenta, o que demonstra que fatores cromossômicos também podem estar envolvidos na indução de apoptose das DCs.

Análises imunohistoquímicas e funcionais das placas de Peyer de camundongos revelaram 3 populações distintas de DCs convencionais, as quais possuem diversas funções. DCs que se localizam na região do dome subepitelial (SED) das PP expressam a molécula CD11b. A segunda sub-população expressa a molécula CD8 $\alpha$  e reside na região interfolicular (IFR) rica em células T das PP. A terceira sub-população não expressa CD11b nem CD8 $\alpha$ , sendo denominada DC duplo negativa (DN), e é encontrada no SED, IFR e no epitélio associado ao folículo (FAE) (SATO e IWASAKI, 2005). As DN DCs são encontradas em maiores porcentagens nos órgãos linfóides das mucosas, tais como as PP (29%) e os linfonodos mesentéricos (30%), e representam uma população menor e indistinta no baço e linfonodos periféricos (13%) (IWASAKI e KELSALL, 2001).

Quanto às sub-populações de DCs presentes nas placas de Peyer, observamos que nos animais C57BL/6 controles o número de DCs CD11b<sup>+</sup> era 20% maior do que o número de DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Estes animais também apresentaram um número 48 vezes maior de DCs CD11b<sup>+</sup> do que a linhagem BALB/c. A infecção por ambas as amostras provocou uma redução desta sub-população nos animais resistentes, sendo mais marcante a redução observada nos animais infectados com a amostra avirulenta, no 1º dia p.i. (67,3 vezes menor). Por outro lado, ocorreu um aumento desta sub-população, durante todo o período de infecção, nos animais suscetíveis infectados com ambas as amostras. A sub-população de DCs CD11b<sup>+</sup> parece ser especializada no processamento de antígenos exógenos para apresentação em associação com moléculas MHC de classe II (DUDZIAK et al., 2007). Esta sub-população é rica em capepsinas C, H e

Z, asparagina endopeptidase (AEP), GILT e H2-Mbeta 1, proteínas implicadas na via de processamento de antígenos através de MHC de classe II (DUDZIAK et al., 2007). Sendo as bactérias do gênero *Yersinia* predominantemente extracelulares (GROSDENT et al., 2002), a presença desta sub-população pode contribuir para a resolução da infecção. Mesmo que a infecção pela bactéria tenha provocado uma redução no número de DCs CD11b<sup>+</sup> nos animais resistentes, a existência de um maior número destas células no início da infecção parece ser determinante do padrão de resistência exibido pelos animais C57BL/6.

Nos animais BALB/c controles a sub-população CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> era 4,8 vezes maior do que a sub-população CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. Mesmo assim, animais C57BL/6 controles apresentaram um número maior de DCs da sub-população CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> do que os BALB/c (8,5 vezes maior). A infecção com ambas as amostras provocou uma diminuição desta sub-população nos animais resistentes, sendo mais evidente a diminuição provocada pela amostra avirulenta no 5º dia p.i. (66,5 vezes menor). Nos animais suscetíveis, a amostra virulenta provocou uma diminuição desta sub-população apenas no 1º dia p.i. e a amostra avirulenta provocou diminuição durante todo o período observado. As DCs CD8α<sup>+</sup> são especializadas na captura de células mortas e exercem papel na resistência a certas infecções virais. Esta sub-população também tem sido associada ao mecanismo de apresentação cruzada, que é a capacidade de processar antígenos que não se replicam, para apresentação para as células T através de moléculas de classe I (DUDZIAK et al., 2007).

Os resultados obtidos quanto às sub-populações de DCs presentes nas PP diferem daqueles obtidos anteriormente por nosso grupo com DCs isoladas de baço. No baço dos camundongos controles, observamos o predomínio da sub-população CD11b<sup>+</sup> tanto nos camundongos BALB/c quanto nos camundongos C57BL/6. A infecção com a amostra virulenta de *Y. pseudotuberculosis* não alterou este padrão (TANSINI, 2008).

Quanto à expressão de marcadores de maturação, verificamos que a expressão da molécula MHC de classe II pelos camundongos C57BL/6 controles foi ligeiramente maior do que pelos BALB/c. A infecção destas duas linhagens de animais por ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* resultou numa redução da expressão desta molécula, o que indica uma regulação negativa provocada pela bactéria. No trabalho anterior realizado com DCs de baço também observamos uma redução da expressão destas moléculas no 1º dia p.i. (TANSINI, 2008).

A expressão das moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) também foi maior nas DCs dos camundongos C57BL/6 controles. A infecção destes animais com a amostra virulenta provocou um aumento da expressão destas moléculas no período inicial da

infecção, com posterior diminuição. A amostra avirulenta provocou diminuição da expressão destas moléculas durante todo o período observado. Portanto, nos animais resistentes à infecção pela amostra virulenta levou à maturação inicial das DCs de PP. Schoppet et al. (2000) demonstraram que a infecção *in vitro* de DCs humanas com *Y. enterocolitica* provocava uma regulação negativa das moléculas de MHC de classe II e de moléculas CD80. Nossos resultados estão de acordo quanto à expressão da molécula de MHC de classe II, mas não para a molécula CD80, pois observamos um aumento da expressão desta molécula no 1º dia p.i. com a amostra virulenta, com posterior diminuição, para ambas as linhagens de camundongos.

Por outro lado, camundongos C57BL/6 controles expressaram menores níveis da molécula de adesão ICAM-1 (CD54) do que os BALB/c. A infecção dos animais resistentes pela amostra virulenta levou a um aumento considerável da expressão desta molécula, maior do que o aumento observado com a amostra avirulenta. Já a infecção dos camundongos suscetíveis com a amostra virulenta levou a uma diminuição na expressão destas moléculas.

Iwasaki e Kelsall (1999) relataram que os níveis de expressão de CD80 e CD86 tanto nas DCs de PP quanto de baço são baixos, indicando que nenhuma destas populações celulares estaria completamente madura ou diferenciada. Isto está de acordo com os achados de Ruedl et al. (1997) que demonstraram que células CD11c<sup>+</sup> recém-isoladas das PP são funcionalmente imaturas. Neste sentido, nossos resultados mostram que as DCs isoladas inicialmente dos camundongos BALB/c seriam ainda mais imaturas do que dos C57BL/6, uma vez que expressavam apenas 14,5% de molécula B7-1 e 7,0% de moléculas B7-2, contra 49,2% e 34,9%, respectivamente, nos camundongos resistentes. Estes dados estão de acordo com os achados de Liu et al. (2002) que relataram que marcadores de maturação tais como CD40, CD6 e Stat 4 são expressos em níveis mais elevados em DCs de camundongos C57BL/6 do que em DC de BALB/c.

Efeitos sobre a maturação de DCs também têm sido descritos para outros patógenos. Foi demonstrado que *Plasmodium falciparum* (URBAN et al., 1999), *Trypanosoma cruzi* (VAN et al., 1999) e vírus herpes simplex (SALIO et al., 1999) previnem a maturação de DCs. A aderência de hemácias infectadas com *P. falciparum* às DCs inibe a maturação destas DCs. No caso do *T. cruzi* um fator solúvel desconhecido é o responsável pela supressão da maturação das DCs. Por outro lado, *Mycobacterium tuberculosis* (HENDERSON et al., 1997), *Streptococcus gordonii* (CORINTI et al., 1999), e *Chlamydia psittaci* (OJCIUS et al., 1998) induzem ativação e maturação de DCs.

A capacidade das DCs das PP dos animais resistentes em induzir a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos foi maior do que aquela apresentada pelos animais suscetíveis. A infecção pela bactéria virulenta provocou um pequeno aumento desta capacidade no 1º e no 3º dias p.i. nos animais BALB/c e um aumento maior nos animais C57BL/6. Estes dados estão de acordo com a maior expressão de moléculas co-estimuladoras observada na superfície das DCs dos animais resistentes, provocada pela infecção, principalmente no 1º e no 3º dias p.i. Porém, estão em desacordo com as observações de Erfuth et al. (2004). Estes autores analisaram a proliferação de células T provocada por DCs obtidas da medula óssea, infectadas *in vitro* com *Y. enterocolitica*. Eles observaram que as DCs infectadas com a bactéria portadora de plasmídeo não provocavam proliferação de células T. Por outro lado, verificaram que a infecção das DCs com a amostra curada do plasmídeo de virulência ou com uma mutante defectiva na secreção de YopP afetava apenas parcialmente a proliferação de células T. Posteriormente, Autenrieth et al. (2007) verificaram que YopP medeia a redução da captura de antígenos, através da sua capacidade de bloquear as vias de sinalização da MAPK nas células do hospedeiro. Além disso, Adkins et al. (2008) verificaram que *Y. enterocolitica* inibe o processamento de antígenos atingindo o processo de degradação dos mesmos, e que este fenômeno é dependente da presença do plasmídeo de virulência pYV, mas não da presença do próprio sistema de secreção do tipo III (TTSS). A bactéria sem plasmídeo não inibe o processo, apenas diminui a degradação de antígeno pelas DCs, competindo com antígenos heterólogos. Portanto, *Y. enterocolitica*, localizada extracelularmente, deve inibir o processamento de antígeno através de fatores patogênicos codificados pelo plasmídeo de virulência pYV que atingem a via de degradação do antígeno pelas DCs, o que deve representar, juntamente com a inibição da captura do antígeno, uma importante estratégia desta bactéria para subverter a capacidade de apresentação do antígeno das células da imunidade inata e prevenir proliferação de células T CD4<sup>+</sup>. Em contraste com estes dados, estudos de Schoppet et al. (2000) revelaram que a infecção de DCs humanas imaturas com *Y. enterocolitica* leva somente a uma supressão transitória da estimulação de células T, que perdura por 5 dias. Num outro estudo, os autores puderam demonstrar que este efeito transitório não é dependente de bactérias viáveis (SCHOPPET E HUPPERTZ, 2001). Até o momento, não existem trabalhos que demonstrem que amostras virulentas de *Y. pseudotuberculosis* também interferem na captura e degradação de antígenos.

As DCs secretam várias citocinas quando expostas ao LPS bacteriano (HAN et al., 1990). As citocinas são mediadoras importantes da resposta imune e sua liberação pode ativar células da imunidade inata e adaptativa. Por exemplo, IL-12, IL-18 e IL-23 podem promover



respostas Th1, ao passo que IL-4 induz respostas Th2. A IL-10 induz células T reguladoras, a IL-12 é também capaz de ativar células NK e o TNF- $\alpha$  exerce um papel principal na resposta inflamatória através do recrutamento e ativação de monócitos e neutrófilos.

As DCs obtidas dos animais controles da linhagem BALB/c apresentaram um padrão de secreção de citocinas próprio das linhagens de camundongos denominadas Th2 (BALB/c, DBA/2), isto é, maior produção de IL-4 e IL-10 do que os animais C57BL/6, que pertencem às linhagens denominadas Th1 (C57BL/6, B10D2) e que secretaram maiores quantidades de IL-12 e TNF- $\alpha$  (LIEW et al, 1991; OSWALD et al., 1992; STENGER et al., 1994).

A infecção por ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* provocou um aumento da secreção de IL-4 pelos camundongos BALB/c, com um pico de produção no 3º dia pi. Nos camundongos C57BL/6 este aumento foi bem mais discreto. Estes resultados diferem daqueles obtidos por nosso grupo com as DCs esplênicas, as quais não produziram IL-4 (TANSINI, 2008), mais uma vez mostrando a diferença observada no comportamento entre as DCs obtidas das PP e do baço (IWASAKI e KELSALL, 1999).

Com relação à produção de IL-10, os maiores aumentos foram observados nos sobrenadantes das DCs dos camundongos BALB/c no 3º dia p.i. com a amostra virulenta. As DCs dos camundongos C57BL/6 também produziram maiores quantidades de IL-10, principalmente aquelas dos animais infectados com a amostra avirulenta. Resultados semelhantes foram observados em trabalho anterior (TANSINI, 2008) em que as DCs esplênicas de ambas as linhagens de camundongos apresentaram elevação na produção de IL-10 durante a infecção com amostra virulenta de *Y. pseudotuberculosis*, mais predominante nos camundongos BALB/c. No 3º e no 5º dias p.i. os níveis da citocina, em ambas as linhagens, começaram a diminuir, porém mantendo-se ainda elevados em relação aos controles.

Sabe-se que as diferentes sub-populações de DCs isoladas das PP possuem a capacidade de produzir diferentes citocinas e, portanto, de influenciar a geração de diferentes respostas de células T CD4<sup>+</sup>. DCs CD11b<sup>+</sup> isoladas de PP secretam IL-10 sob estimulação *in vitro* e induzem células T CD4<sup>+</sup> virgens antígeno-específicas a secretar altos níveis de IL-10 e IL-4 (SATO e IWASAKI, 2005). Observamos que a infecção provocou um aumento desta sub-população nos animais BALB/c, coerente com a maior produção de IL-10.

Por outro lado, DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> e DN DCs isoladas de PP secretam IL-12 e induzem respostas Th1 (SATO e IWASAKI, 2005). Em nosso estudo, as DCs das PP dos animais de ambas as linhagens infectados com a bactéria (tanto Yp<sup>+</sup> quanto Yp<sup>-</sup>) produziram altos níveis de IL-12. A maior produção ocorreu nos animais C57BL/6 infectados com a amostra Yp<sup>+</sup> no 3º dia p.i. Embora a infecção tenha reduzido o número de DCs da sub-população CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>,

ainda assim a produção de IL-12 permaneceu elevada. Provavelmente as células responsáveis por esta alta secreção de IL-12 sejam as DN DCs. Mais uma vez os resultados obtidos com as DCs de PP diferiram daqueles obtidos com as DCs esplênicas. Estas células apresentaram uma diminuição na produção de IL-12 no início da infecção, mais predominante nos camundongos BALB/c, seguida de elevação no 5º dia p.i., com valores mais acentuados para linhagem C57BL/6 (TANSINI, 2008).

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pró-inflamatória. A infecção de camundongos BALB/c com ambas as amostras provocou um aumento progressivo na secreção desta citocina pelas DCs das PP. Já nos camundongos C57BL/6, a amostra virulenta (Yp<sup>+</sup>) provocou um maior aumento na secreção de TNF- $\alpha$  no 1º dia p.i., ocorrendo uma redução a seguir, mas que se manteve maior que a secreção observada nos animais controles. A amostra avirulenta (Yp<sup>-</sup>) provocou aumento gradativo em todo o período analisado. No trabalho realizado com DCs esplênicas verificamos que ambas as linhagens de camundongos apresentaram diminuição significativa no 1º dia p.i.. No 5º dia p.i., uma elevação significativa foi determinada em ambas as linhagens, contudo com maior produção por camundongos C57BL/6.

Nossos resultados também diferem dos obtidos por Erfuth et al. (2004) com infecção *in vitro* de DCs obtidas de medula óssea com *Y. enterocolitica*. Estes autores verificaram que *Y. enterocolitica* suprime a produção de citocinas pelas DCs, incluindo IL-12, IL-10 e TNF- $\alpha$ , e que este efeito é mediado por YopP, codificada pelo plasmídeo de virulência.

Na ausência de estímulos patogênicos, antígenos protéicos administrados por via oral resultam normalmente na geração de respostas imunes supressoras (DAYNES et al., 1990; WEINER, 2001). Células Th3, Tr-1 e Treg podem suprimir respostas imunes a antígenos ingeridos e são, provavelmente, responsáveis por mediar a tolerância oral. Apesar da capacidade de gerar respostas Th2, Th3, Tr-1 ou Treg nas PP, diversas respostas Th1 são observadas nas PP, particularmente após infecção intestinal com microrganismos patogênicos. Por exemplo, secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T das PP tem sido observada após infecção gastrintestinal com *Salmonella typhimurium* (GEORGE, 1996; KAREM et al., 1996) e *Toxoplasma gondii* (LIESENFELD et al., 1997). O mecanismo que explica a habilidade das PP gerarem respostas de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, ainda permitindo a diferenciação de respostas Th1 após infecção com organismos patogênicos, é de grande interesse. Um possível mecanismo é que DCs especializadas estejam presentes na geração de distintas respostas Th. Dando suporte a esta hipótese, DCs totais das PP sensibilizam células T CD4<sup>+</sup> virgens para

secretar IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ , ao passo que DCs esplênicas induzem células T CD4<sup>+</sup> virgens a secretar predominantemente IFN- $\gamma$  (IWASAKI e KELSALL, 1999).

Respostas potencialmente protetoras podem ser modificadas por fatores de virulência que são produzidos por famílias, espécies ou cepas de patógenos. Estes fatores de virulência sinalizam através de PRRs e facilitam a sobrevivência de patógenos, iniciando cascatas de sinalização que bloqueiam o aspecto protetor de células imunes (KAPSENBERG, 2003). Embora existam muitas informações a respeito dos mecanismos usados por *Y. pseudotuberculosis* para evadir do sistema imune inato do hospedeiro, pouco se sabe sobre como ela atua sobre a resposta imune adaptativa. No entanto, sabe-se que as células T são essenciais para eliminar as bactérias do gênero *Yersinia*. Nosso trabalho, ao avaliar o papel da infecção pela bactéria sobre as populações de linfócitos T isolados de PP, constatamos que ambas as amostras bacterianas provocaram uma diminuição no número destas células nos animais C57BL/6. A amostra avirulenta produziu aumentos significativos apenas no 3º d.p.i nos animais BALB/c. Zhao et al. (2000) demonstraram evidências de extensa apoptose no baço de animais C57BL/6 infectados com *Y. enterocolitica*, acompanhada por um decréscimo seletivo na população CD4<sup>+</sup> de esplenócitos. A redução observada nos animais C57BL/6 possivelmente foi causada por uma apoptose nessa linhagem, não só relacionada aos fatores plasmídeos e cromossômicos bacterianos. Quanto à sub-população CD4<sup>+</sup>, observamos um aumento destas células em ambas as linhagens de animais e para as duas amostras utilizadas; porém, a relação CD4/CD8 nos camundongos BALB/c foi maior do que nos C57BL/6 (mais células Th CD4<sup>+</sup> do que células T citotóxicas) durante todo o período da infecção. Handley et al. (2004) também observaram predomínio de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ao imunofenotipar linfócitos T de camundongos BALB/c infectados por via oral com *Y. enterocolitica*. Porém, estes autores verificaram o oposto em camundongos C57BL/6, ou seja, predomínio de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Aumentos da sub-população CD8<sup>+</sup> foram observados nos animais BALB/c (Yp<sup>+</sup>) durante todo o período analisado, e no 3º e no 5º dias p.i. nos animais BALB/c (Yp<sup>-</sup>). Os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram aumentos significativos apenas no 3º dia p.i. com a amostra Yp<sup>+</sup>. Estas diferenças podem ser explicadas pela diferença na espécie de *Yersinia* utilizada nos 2 estudos.

Os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório com camundongos BALB/c infectados por via intravenosa com *Y. pseudotuberculosis* (MONNAZZI, 2007) diferem um pouco dos resultados atuais. Observamos uma diminuição do número de linfócitos T esplênicos nos animais infectados tanto com a amostra virulenta quanto com a avirulenta. A infecção com a amostra virulenta também causou uma diminuição das populações CD4<sup>+</sup> e

CD8<sup>+</sup>. A amostra avirulenta causou diminuição apenas da população CD4<sup>+</sup>. Devemos levar em consideração que as diferenças encontradas podem ser devidas à via de inoculação utilizada. A administração da bactéria por via intravenosa expõe o hospedeiro imediatamente a uma infecção sistêmica com os sítios primários de infecção, isto é, aqueles que filtram o sangue, como baço e fígado. Entretanto, *Yersinia enterocolitica* é geralmente adquirida naturalmente por via oral (por ex., ingestão de alimentos contaminados), a qual expõe a bactéria ao ambiente do sistema imune das mucosas antes da disseminação para tecidos mais profundos como o baço, pulmões e fígado (HANDLEY et al., 2004). Portanto, os linfócitos das PP podem apresentar um comportamento diferente dos linfócitos esplênicos.

Estudos iniciados por Autenrieth e seguidos por Bohn e Autenrieth têm demonstrado vários mecanismos potenciais para explicar a resistência aumentada de camundongos C57BL/6 em relação aos BALB/c num modelo de infecção por *Y. enterocolitica* administrada por via intravenosa (AUTENRIETH et al., 1994; AUTENRIETH et al., 1993; BOHN e AUTENRIETH, 1996; BOHN et al., 1994; BOHN et al., 1998; BOHN et al., 1998; HEIN et al., 2000). Estes trabalhos demonstram que com o progresso da infecção por via intravenosa, os baços dos animais C57BL/6 montam uma resposta inflamatória pronunciada. Camundongos BALB/c apresentam uma ativação tardia de células T esplênicas correlacionada com níveis de citocinas Th1, resultando num estado de suscetibilidade aumentada comparada com C57BL/6. Também é um fato bem conhecido que as Yops secretadas por *Yersinia* spp. interferem na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção. Brubaker (2003) demonstrou que os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos órgãos linfóides de camundongos infectados com uma amostra de *Y. pestis* portadora do plasmídeo de virulência eram bem menores do que os níveis apresentados pelos órgãos dos animais infectados com a amostra curada do plasmídeo. No entanto, o mecanismo usado pelas Yops para interferir com a produção das citocinas é multifatorial e complexo.

Nossos resultados obtidos quanto à detecção de citocinas intracelulares nos linfócitos isolados das PP demonstraram níveis mais elevados de IL-2 nos linfócitos dos camundongos controles C57BL/6 do que nos BALB/c. A infecção pela bactéria, tanto Yp<sup>+</sup> quanto Yp<sup>-</sup>, resultou num aumento no nível desta citocina nos camundongos BALB/c, tanto nos linfócitos CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, e uma diminuição nos níveis de IL-2 nos camundongos C57BL/6. Este resultado também difere do obtido anteriormente com os linfócitos esplênicos de camundongos BALB/c, em que observamos uma diminuição na produção de IL-2 apenas nos animais infectados com a amostra Yp<sup>+</sup>, sugerindo que este efeito era devido à ação das Yops (MONNAZZI, 2007).

O perfil de produção de IL-4 apresentou-se semelhante ao observado para IL-2. Os linfócitos das PP de camundongos C57BL/6 controles também apresentaram níveis mais elevados de IL-4 intracelular do que os BALB/c. Já foi descrito que LT-CD4 esplênicos de camundongos BALB/c produzem quantidades maiores de IL-4 do que os linfócitos de camundongos C57BL/6, e que esta habilidade é genética e não está sob controle dos genes do MHC (NISHIMURA et al., 1997). Portanto, aqui também observamos um comportamento diferente entre os linfócitos das PP e os linfócitos esplênicos quanto à produção de IL-4. Sabe-se que as DCs das PP estimulam preferencialmente clones Th0 a produzir grandes quantidades de IL-4 (IWASAKI e KELSALL, 1999). A infecção por ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* provocou um aumento na produção de IL-4 nos camundongos BALB/c. Este resultado está de acordo com nossas observações de que a infecção dos camundongos BALB/c com ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* provocou um aumento da secreção de IL-4 pelas DCs das PP, as quais estariam influenciando a produção de citocinas de padrão Th2 pelos linfócitos T destes animais. Já nos camundongos C57BL/6, a infecção provocou uma diminuição na produção de IL-4 pelos linfócitos T das PP. A infecção de camundongos BALB/c por via intravenosa com ambas as amostras (MONNAZZI, 2007) não provocou alteração nos níveis de IL-4 produzidos por LT-CD4 esplênicos. A amostra virulenta também não provocou alterações nos níveis de IL-4 produzidos pelos LT-CD8.

Camundongos C57BL/6 controles produziram maiores quantidades de IL-10 do que os BALB/c. A infecção por ambas as amostras da bactéria provocou o aumento da produção de IL-10 pelos linfócitos das PP de camundongos BALB/c e diminuiu a produção pelos C57BL/6. Os resultados obtidos com os linfócitos das PP de camundongos BALB/c também diferem dos obtidos anteriormente com linfócitos esplênicos; neste caso pudemos constatar uma supressão da produção de IL-10 com ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* (MONNAZZI, 2007). O excesso de produção de citocinas antagonistas tais como IL-4, IL-10 ou TGF- $\beta$  pelos camundongos BALB/c tem sido proposto como um possível mecanismo para explicar a maior suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *Yersinia* (AUTENRIETH et al., 1994). O aumento dos níveis de IL-10 pode ser favorável à permanência da bactéria no hospedeiro devido às suas propriedades antiinflamatórias.

Em relação à produção da citocina IFN- $\gamma$ , verificamos que os linfócitos de camundongos C57BL/6 controles produziram maiores quantidades dessa citocina, principalmente os linfócitos T-CD8<sup>+</sup>. De maneira geral, os animais BALB/c infectados apresentaram um aumento na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, principalmente pelos linfócitos T-CD8<sup>+</sup> e para a amostra bacteriana Yp<sup>+</sup>. Esse aumento coincidiu com os aumentos

significativos de LT-CD8<sup>+</sup> ocorridos durante todo o período da infecção nesses animais e para essa amostra bacteriana. Conhecendo-se a importância do IFN- $\gamma$  na ativação das mais diversas células do sistema imune e sabendo-se que camundongos BALB/c são maus produtores do mesmo, tem-se a impressão de que os linfócitos presentes nas PP destes animais, principalmente os LT-CD8<sup>+</sup>, aumentam a produção local desta citocina numa tentativa de combater a infecção no local de penetração do microrganismo. Em trabalho anterior verificamos que a infecção por via intravenosa com ambas as amostras de *Y. pseudotuberculosis* suprimiu a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos esplênicos T CD4<sup>+</sup> mas aumentou a produção desta citocina pelos LT-CD8<sup>+</sup> (MONNAZZI, 2007).

A infecção pela bactéria diminuiu os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelos linfócitos das PP de camundongos C57BL/6. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Zhao et al. (2000) que verificaram que, no 5º dia p.i., ocorria uma produção diminuída desta citocina pelos linfócitos estimulados com ConA, comparados aos controles.

No geral, os resultados obtidos quanto à determinação das citocinas intracelulares presentes nos linfócitos T das PP mostraram não haver uma polarização da resposta para nenhum dos perfis (Th1 ou Th2) durante a infecção com *Yersinia*, dados estes já relatados por outros autores (BUHLER et al., 2006; MONNAZZI, 2007). Além disso, confirmaram a maior produção de citocinas antagonistas pelos camundongos suscetíveis. E mais ainda, os resultados obtidos com a amostra Yp<sup>-</sup> mostraram que outros fatores de virulência, além das Yops, interferem na produção e secreção das citocinas.

## 6. CONCLUSÕES

1. As DCs de PP dos camundongos BALB/c controles apresentam uma maior expressão de moléculas ICAM-1 e maiores secreções de IL-4 e IL-10 do que as DCs dos camundongos C57BL/6 controles;
2. Camundongos C57BL/6 controles apresentam um número maior de LT, DCs e suas subpopulações do que camundongos BALB/c controles;
3. As DCs de PP dos camundongos C57BL/6 controles apresentam maiores expressões de moléculas MHC II, B7.1 e B7.2, e maiores secreções de IL-12 e TNF- $\alpha$  do que as DCs dos camundongos BALB/c controles;
4. Camundongos C57BL/6 controles produzem maiores quantidades das citocinas intracelulares IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  pelos LT do que os camundongos BALB/c controles;
5. A produção das citocinas IL-4 e IL-10 por LT de PP em camundongos BALB/c confirma a maior produção de citocinas antagonistas pelos camundongos suscetíveis durante a infecção por *Yersinia*;
6. A existência de um número maior de DCs da sub-população CD11b<sup>+</sup> parece ser determinante do padrão de resistência exibido pelos animais C57BL/6;
7. A infecção pela amostra virulenta (YpIII pIB1) leva à maturação inicial das DCs de PP nos camundongos BALB/c e C57BL/6, que pode ser observada pelos aumentos das expressões das moléculas B7.1 e B7.2;
8. A infecção por YpIII pIB1 aumenta a capacidade das DCs de PP dos animais C57BL/6 em induzir a ativação dos linfócitos T antígeno-específicos, maior do que a dos animais BALB/c. E esse aumento da capacidade de estimulação em C57BL/6 coincide com os aumentos das expressões de moléculas B7.1 e B7.2;

9. A infecção por *Y. pseudotuberculosis* desencadeia um aumento de IL-10 por DCs de PP nos camundongos de ambas as linhagens, predominantemente nos camundongos BALB/c. Nesses animais o aumento de IL-10 coincide com o aumento de DC CD11b<sup>+</sup>;
10. A produção das citocinas intracelulares presentes nos linfócitos T das PP demonstrou não haver uma polarização da resposta para nenhum dos perfis (Th1 ou Th2) durante a infecção com *Yersinia*;
11. Outros fatores de virulência, além das Yops, interferem na produção e secreção das citocinas.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, M.; GALLOWAY, A.; CUNNINGHAM, J. L. Haemochromatosis presenting with a double *Yersinia* infection. **J. Infect.**, v.13, p.143-145, 1986.

ACKERMAN, A.L.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. **Nat Immunol**, v.6, p.107-113, 2005.

ADAMS, S.; O'NEILL, D.W.; BHARDWAJ, N. Recent advances in dendritic cell biology. **J. Clin. Immunol**, v.25, p.87-98, 2005.

ADKINS, I.; KOBERLE, M.; GROBNER, S.; AUTENRIETH, S.A.; BOHN, E.; BORGMANN, S.; AUTEHRIETH, I.B. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. **Microbes Infect.**, v.10, p. 798-806, 2008.

ALONSO, A.; BOTTINI, N.; BRUCKNER, S.; RAHMOUNI, S.; WILLIAMS, S.; SCHOENBERGER, S.P.; MUSTELIN, T. Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.4922-4928, 2004.

ARDAVÍN, C.; MARTÍNEZ DEL HOYO, G.; MARTÍN, P.; ANJUÈRE, F.; ARIAS, C.F.; MARÍN, A.R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNÁNDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.**, v.22, n.12, p.691-700, 2001.

AUTENRIETH, I.B.; BEER, M.; BOHN, E.; KAUFMANN, S.H.; HEESEMANN, J. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. **Infect. Immun.**, v.62, p.2590-2599, 1994.

AUTENRIETH, I.B.; BEER, M.; HANTSCHMANN, P.; PREGER, S.; VOGEL, U.; HEYMER, B.; HEESEMAN, J. The cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in different strains of mice: evidence for an important role of T lymphocytes. **Zenbl. Bakteriolog.**, v.278, p.383-395, 2003.

AUTENRIETH, I.B.; FIRSCHING, R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.285-294, 1996.

AUTENRIETH, I.B.; HEESEMANN, J. In vivo neutralization of necrosis factor alpha interferon gamma abrogates to *Yersinia enterocolitica* in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.181, p.333-338, 1992.

AUTENRIETH, I.B.; TINGLE, A.; RESKE-KUNZ, A.; HEESEMANN, J. T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.60, p.1140-1149, 1992.

AUTENRIETH, I.B.; VOGEL, U.; PREGER, S.; HEYMER, B.; HEESEMANN, J. et al. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. **Infect Immun.**, v.61, p.2585-2595, 1993.

AUTENRIETH, S.E.; SOLDANOVA, I.; ROSEMANN, R.; GUNST, D.; ZAHIR, N.; KRACHT, M.; RUCKDESCHEL, K.; WAGNER, H.; BORBMANN, S.; AUTENTIETH, I.B. *Yersinia enterocolitica* YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells. **Cell. Microbiol.**, v.9, n.2, p.425-437, 2007.

BALADA-LLSAT, J.Q.; MECSAS, J. *Yersinia* has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system. **Plos Pathog.**, v.2, p.816-828, 2006.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p.767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, p.245-252, 1998.

BARNES, P.D.; BERGMAN, M.A.; MECSAS, J.; ISBERG, R.R. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. **J. Exp. Med.**, v.203, p.1591-1601, 2006.

BLACK D.S.; MONTAGNA, L.G.; ZITSMANN, S.; BLISKA, J.B. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. **Mol. Microbiol.**, v.29, p.1263-1274, 1998.

BLACK, D.S.; BLISKA, J.B. Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.**, v.16, p.2730-2744, 1997.

BLUESTONE, J.A.; ABBAS, A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature Rev. Immunol.**, v.3, p.253-257, 2003.

BOHN, E.; AUTENRIETH, I.B. IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN- $\gamma$  production in NK cells and CD4<sup>+</sup> T cells. **J. Immunol.**, v.156, p.1458-1468, 1996.

BOHN, E.; HEESEMANN, J.; EHLERS, S.; AUTENRIETH, I.B. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.62, p.3027-3032, 1994.

BOHN, E.; SCHMITT, E.; BIELFELDT, C.; NOLL, A.; SCHULTE, R.; AUTENRIETH, I.B. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. **Infect. Immun.**, v.66, p.2213-2220, 1998.

BOHN, E.; SING, A.; ZUMBIHL, R.; BIELFELDT, C.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; HEESEMANN, J.; AUTENRIETH, I.B. IL-18 (IFN-gamma inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. **J. Immunol.**, v.160, p.200-307, 1998.

BOLAND, A.; CORNELIS, G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. **Infect. Immun.**, v.66, p.1878-1884, 1998.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.257-276, 1997.

BRUBAKER, R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.309-324, 1991.

BRUBAKER, R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). **Infect. Immun.**, v.71, p.3673-3681, 2003.

BUHLER, O.T.; WIEDIG, C.A.; SCHMID, Y.; GRASSL, G.A.; BOHN, E.; AUTENRIETH, I.B. The *Yersinia enterocolitica* invasin protein promotes major histocompatibility complex class I- and class II-restricted T-cell responses. **Infect. Immun.**, v.74, p.4322-4329, 2006.

CARNIEL, E. Plasmids and pathogenicity islands of *Yersinia*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.264, p.89-108, 2002.

CARTER, P.B.; COLLINS, F.M. Animal models for human disease. **Am. J. Pathol.**, v.81, p.703-705, 1975.

CORINTI, S., MEDAGLINI, D.; CAVANI, A.; RESCIGNO, M.; POZZI, G.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; GIROLOMONI, G. Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. **J. Immunol.**, v.163, p.3029-3036, 1999.

CORNELIS, G.R.; BOLAND, A.; BOYD, A.P.; GEUIJEN, C.; IRIARTE, M.; NEYT, C.; SORY, M-P.; STAINER, I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v.62, n.4, p.1315-1352, 1998.

CORNELIS, G.R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. **Mol. Microbiol.**, v.23, p.861-867, 1997.

CORNELIS, G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. **J. Cell. Biol.**, v.158, p.401-408, 2002.

DAYNES, R.A.; ARANEO, B.A.; DOWELL, T.A.; HUANG, K.; DUDLEY, D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over t helper cell function. **J. Exp. Med.**, v.171, p.979-996, 1990.

DENECKER, G.; DECLERCK, W.; GEUIJEN, C.A.; BOLAND, A.; BENABDILLAH, R.; van GURP, M.; SORY, M.P.; VANDENABEELE, P.; CORNELIS, G.R. *Yersinia enterocolitica* YoP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.19706-19714, 2001.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A.O.; HEIDKAMP, G.F.; BUCHHOLZ, V.R.; TRUMPFHELLER, C.; YAMAZAKI, S.; CHEONG, C.; LIU, K.; LEE, H-W.; PARK, C.G.; STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v.315, p.107-111, 2007.

ERFURTH, S.E.; GRÖBNER, S.; KRAMER, U.; GUNST, D.S.J.; SOLDANOVA, I.; SCHALLER, M.; AUTENRIETH, I.B.; BORGMANN, S. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. **Infect. Immun.**, v.72, p.7045-7054, 2004.

EVDOKIMOV, A.G.; ANDERSON, D.E.; ROUTZAHN, K.M.; WAUGH, D.S. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. **J. Mol. Biol.**, v.312, p.807-821, 2001.

FALLMAN, M.; ANDERSSON, K.; HAKANSSON, S.; MAGNUSSON, K.E.; STENDAHL, O.; WOLF-WATZ, H. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. **Infect. Immun.**, v.63, p.3117-3124, 1995.

FONTENEAU, J.F.; GILLIET, M.; LARSSON, M.; DASILVA, I.; MÜNZ, C.; LIU, Y.J.; BHARDWAJ, N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. **Blood**, v.101, p.3520-3526, 2003.

FORSBERG, A.; ROSQVIST, R.; WOLF-WATZ, H. Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. **Trends. Microbiol.**, v.2, p.14-19, 1994.

GALIOV, E.E; HAKANSSON, S; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. **Nature**, v.361, p.730-732, 1993.

GATTI, E.; VELLECA, M.A.; BIEDERMANN, B.C.; MA, W.; UNTERNAEHRER, J.; EBERSOLD, M.W. ; MEDZHITOV, R.; POBER, J.S.; MELLMAN, I. Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factormobilized CD34\_ progenitors. **J. Immunol**, v.164, p.600-607, 2000.

GEORGE, A. Generation of gamma interferon responses in murine Peyer's patches following oral immunization. **Infect. Immun.**, v.64, p.4606-4611, 1996.

GRANUCCI, F.; FOTI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell biology. **Adv. Immunol**, v.88, p.193-233, 2005.

GREEN, L.C.D.; WAGNER, D.D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKEPPER, P.L.; WISHNOK, J.; TANNEBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Ann. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.

GRÖBNER, S.; AUTENRIETH, S.E.; SOLDANOVA, I.; GUNST, D.S.J.; SCHALLER, M.; BOHN, E.; MÜLLER, S.; LEVEKUS, M.; WESSELBORG, S.; AUTENRIETH, I.B.; BORGMANN, S. *Yersinia* YopP-induced cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. **Apoptosis**, v.11, p.1959-1968, 2006.

GROSDENT, N.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; SORY, M.P.; CORNELIS, G.R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. **Infect. Immun.**, v.70, p.4165-4176, 2002.

GROUARD, G.; RISSOAN, M.C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y.J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. **J Exp Med**, v.185, p.1101-1111, 1997.

GRUTZKAU, A.; HANSKI, C.; HAHN, H.; RIECKEN, E.O. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and the enteroinvasive bacteria. **Gut**, v.31, p.1011-1015, 1990.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M.; DAVOUST, J.; VAN ENDERT, P.; AMIGORENA, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v.425, p.397-402, 2003.

HAKANSSON, S.; GALYOV, E.E.; ROSQVIST, R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of HeLa plasma membrane. **Mol. Microbiol.**, v.20, p.593-603, 1996.

HAMID, N.; GUSTAVSSON, A.; ANDERSSON, K.; MCGEE, K.; PERSSON, C.; RUDD, C.E.; FALLMAN, M. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. **Microb. Pathog.**, v.27, p.231-242, 1999.

HAN, J.; BROWN, T.; BEUTLER, B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. **J. Exp. Med.**, v. 171, p.465-475, 1990.

HANDLEY, S.A.; DUBE, P.H.; REVELL, P.A.; MILLER, V.L. Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. **Infect. Immun.**, v.72, n.3, 2004.

HANSKI, C.; NAUMANN, M.; HAHN, H.; RIECKEN, E.O. Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.178, p.289-296, 1989.

HART, D.N.J. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **J. Amer. Soc. Hematol.**, v.90, n.9, p.3245-3287, 1997.

HARTLAND, E.L.; ROBINS-BROWNE, R.M. Infections with enteropathogenic *Yersinia* species: paradigms of bacterial pathogenesis. **Rev. Med. Microbiol.**, v.9, n.4, p.191-205, 1998.

HEATH, W.R.; BELZ, G.T.; BEHRENS, G.M.; SMITH, C.M.; FORECHAN, S.P.; PARISH, I.A.; DAVEY, G.M.; WILSON, N.S.; CARBONE, F.R.; VILLADANGOS, J.A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunol. Rev.**, v.199, p.9-26, 2004.

HEESEMAN, J.; SING, A.; TRÜLSCH, K. *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptative immune defense. **Curr Opin Immunol**, v.9, p55-61, 2006.

HEIN, J.; KEMPF, V.A.J.; DIEBOLD, J.; BÜCHELER, N.; PREGER, S.; HORAK, I.; SING, A.; KRAMER, U.; AUTENRIETH, I.B. Interferon consensus sequence binding protein confers resistance against *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.68, n.3, p.1408-1417, 2000.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon  $\gamma$  or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T subsets. **J. Exp. Med.**, v.169, p.59-72, 1989.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; MUTHA, S.S.; LOCKSLEY, R.M. Production of interferon-gamma, interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.7011-7015, 1991.

HENDERSON, R.A.; WATKINS, S.C.; FLYNN, J.L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.**, v.159, p.635-643, 1997.

HERMANN-MÄRKER, E.; HÖHLER, T. Pathogenesis of human leukocytes antigen B27-positive arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.24, n.4, p.865-881, 1998.

HODGKINS, P.D.; LEE, J.H.; LYONS, A.B. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. **J. Exp. Med.**, v.184, p.277-281, 1996.



HOLMSTRÖM, A.; ROSQVIST, R.; WOLF-WTZ, H.; FORSBERG, A. Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. **Infect. Immun.**, v.63, n.6, p.2269-2276, 1995.

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E.; BRUNET, S.; GOYETTE, G.; LAPLANTE, A.; PRINCIOTTA, M.F.; THIBAUT, P.; SACKS, D.; DESJARDINS, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. **Nature**, v.425, p.402-406, 2003.

HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development *in vitro*. **J. Exp. Immunol.**, v.181, p.713-721, 1995.

INABA, K.; SCHULER, G.; WITMER, M.D.; VALINKSY, J.; ATASSI, B.; STEINMAN, R.M. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes **J. Exp. Med.**, v.164, p.605-613, 1986.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v.176, n.6, p.1693-1702, 1992.

IRIARTE, M.; CORNELIS, G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Mol. Microbiol.**, v.29, p.915-929, 1998.

IWASAKI, A.; KELSALL, B.L. Unique functions of CD11b<sup>+</sup>, CD8 alpha<sup>+</sup>, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. **J. Immunol.**, v.166, p.4884-4890, 2001.

IWASAKI, A.; KELSALL, B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. **J. Exp. Med.**, v.190, n.19, p.229-239, 1999.

JARROSSAY, D.; NAPOLITANI, G.; COLONNA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition

by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v.31, p.3388-3398, 2001.

JUNG, S.; UNUTMAZ, D.; WONG, P.; SANO, G.; DE LOS SANTOS, K.; SPARWASSER, T.; WU, S.; VUTHOORI, S.; KO, K.; ZAVALA, F.; PAMER, E.G.; LITTMAN, D.R.; LANG, R.A. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, v.17, p.211-220, 2002.

JURIS, S.J.; SHAO, F.; DIXON, J.E. *Yersinia* effectors target mammalian signaling pathways. **Cell Microbiol.**, v.4, p.201-211, 2002.

KADAOUI, K.A.; CORTHÉSY, B. Isolation of dendritic cells from mouse Peyer's patches using magnetic cell sorting. **MACS&more**, v.8, n.1, p.10-12, 2004.

KADOWAKI, N.; ANTONENKO, S.; LAU, J.Y.; LIU, Y.J. Natural interferon  $\alpha/\beta$ -producing cells link innate and adaptive immunity. **J. Exp. Med.**, v.192, p.219-226, 2000.

KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; MALEFYT, R.W.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, F.; LIU, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll like receptors and respond to different microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v.194, p.863-869, 2001.

KAPSENBERG, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, p.984-993, 2003.

KAREM, K.L.; KANANGAT, S.; ROUSE, B.T. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated *Salmonella* vaccine strains. **Vaccine**, v.14, p.1495-1502, 1996.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol. Lett.**, v.78, p.113-122, 2001.

KERSCHEN, E.J.; COHEN, D.A.; KAPLAN, A.M.; STRALEY, S.C. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. **Infect. Immun.**, v.72, p.4589-602, 2004.

KRAMER, U.; WIEDIG, C.A. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. **Immunol. Letters**, v.100, p.130-138, 2005.

KRUG, A.; ROTHENFUSSER, S.; HORNUNG, V.; JAHRSDORFER, B.; BLACKWELL, S.; BALLAS, Z.K.; ENDRES, S.; KRIEG, A.M.; HARTMANN, G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v.31, n.7, p.2154-2163, 2001.

LEUNG, K.Y.; REISNER, B.S.; STRALEY, S.C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. **Infect. Immun.**, v.58, p.3262-3271, 1990.

LIAN, C.J.; HWANG, W.S.; KELLY, J.K.; PAI, C.H. Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in vivo study. **J. Med. Microbiol.**, v.24, p.219-226, 1987.

LIESEFELD, O.; KOSEK, J.; SUZUKI, Y. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patches T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v.53, p.4682-4689, 1997.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, M.; ROGERS, V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.21, p.3009-3014, 1991.

LIU, T.; MATSUGUSHI, T.; TSUBOI, N.; YAJIMA, T.; YOSHIKAI, Y. Differences in expression of Toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v.70, n.12, p.6638-6645, 2002.

LIU, Y. J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.23, p.275-306, 2005.

LOGSDON, L.K.; MECSAS, J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. **Infect. Immun.**, v.74, p.1516-1527, 2006.

LOMBARDI, T.; HAUSER, C.; BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. **J. Oral Pathol.**, v.22, p.193-202, 1993.

MAILLIARD, R.B.; WANKOWICZ-KALINSKA, A.; CAI, Q.; WESA, A.; HILKENS, C. M.; KAPSENBERG, M.L.; KIRKWOOD, J.M.; STORKUS, W.J.; KALINSKI, P. Type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. **Cancer Res.**, v.64, p.5934-5937, 2004.

MALDONADO-LOPEZ, R.; MALISZEWSKI, C.; URBAIN, J.; MOSER, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. **J. Immunol.**, v.167, p.4345-4350, 2001.

MCDONALD, C.; VACRATISIS, P.O.; BLISKA, J.B.; DIXON, J.E. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. **J. Chem.**, v. 278, p.18514-18523, 2003.

MCLELLAN, A.D.; KÄMPGEN, E. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. **Immunol. Let.**, v.72, p.101-105, 2000.

MILLS, S.D.; BOLAND, A.; SORY, M-P.; SMISSEN, P.V.D.; KERBOURCH, C.; FINLAY, B.B.; CORNELI, G.R. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion an translocation mechanisms and involving YopP presumably acting as an effector protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.12638-12643, 1997.

MISHELL, B.B.; SHIIGI, S.M. (Eds) **Selected methods in cellular immunology**. New York: W. H. Freeman, 1980.

MONACK, D.M.; MECASAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for his cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.10385-10390, 1997.

MONACK, D.M.; MECSAS, J.; BOULEY, D.; FALKOW, S. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. **J. Exp. Med.**, v. 188, p.2127-2137, 1998.

MONNAZZI, L.G.S. **Papel das Yops de *Yersinia pseudotuberculosis* na modulação da resposta imune celular durante infecção experimental.** 2007. 127f. Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2007.

MONNAZZI, L.G.S.; CARLOS, I.Z.; MEDEIROS, B.M.M. Influence of *Yersinia pseudotuberculosis* outer protein (Yops) on interleukin-2, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Immunol. Lett.**, v.94, p.91-98, 2004.

MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KAWASHIMA, M.; HARADA, S.; TSUJI, K.; SHIBUYA, K.; MARUVAMA, K.; MAKINO, H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.41, n.9, p.1669-1676, 1998.

MOSER, M.; MURPHY, K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nat. Immunol.**, v.1, p.199-205, 2000.

NAVARRO, L.; ALTO, N.M.; DIXON, J.E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Curr Opin Microbiol**, v.8, p.21-27, 2005.

NEUTRA, M.R.; PRINGAULT, E.; PIERRE, J. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.275-300, 1996.

NIESS, J.H.; REINECKER, H.C. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. **Cell Microbiol**, v.8, p.558-564, 2006.

NISHIMURA, T.; SANTA, K.; YAHATA, T.; SATO, N.; OHTA, A.; OHMI, Y.; SATO, T.; HOZUMI, K.; HABU, S. Involvement of IL-4-producing Vbeta8.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD45RB<sup>-</sup> T cells in non-MHC gene-controlled predisposition toward skewing into T helper type-2 immunity in BALB/c mice. **J. Immunol.**, v.158, p.5698-5706, 1997.

OJCIUS, D.M.; BRAVO DE, A.Y.; KANELLOPOULOS, J.M.; HAWKINS, R.A.; KELLY, K.A.; RANK, R.G.; UTRY-VARSAT, A. Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. **J. Immunol.**, v.160, p.1297-1303, 1998.

ORTH, K.; XU, Z.; MUDGETT, M.B.; BAO, Z.Q.; PALMER, L.E.; BLISKA, J.B.; MANGEL, W.F.; STASKAWICZ, B.; DIXON, J.E. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. **Science**, v.290, p.1594-1597, 2000.

OSWALD, I.P.; AFRONN, S.; BRAY, D.; PETIT, J.F.; LEMAIRE, G. Low response of BALB/c macrophages to priming and activating signals. **J. Leukocyte Biol.**, v.52, p.315-322, 1992.

PAGLIARI, L.J.; PERLMAN, H.; LIU, H.; POPE, R.M. Macrophages require constitutive NF-kappa B activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. **Mol. Cell. Biol.**, v.20, p.8855-8865, 2000.

PALMER, L.E.; HOBBIE, S.; GALÁN, J.E.; BLISKA, J.B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- $\alpha$  production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. **Mol. Microbiol.**, v.27, p.953-965, 1998.

PERRY, R.D.; FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.35-66, 1997.

PERSSON, C.; CARBALLEIRA, N.; WOLF-WATZ, H.; FALLMAN, M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these protein in peripheral focal adhesion. **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.**, v.16, p.2307-2318, 1997.

PORTNOY, D.A.; MOSELEY, S.L.; FALKOW, S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.31, p. 775-782, 1981.

PUJOL, C.; BLISKA, J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. **Clin. Immunol.**, v.114, p.216-226, 2005.

PULENDRAN, B.; KUMAR, P.; CUTLER, C.W.; MOHAMADZADEH, M.; VAN DYKE, T.; BANCHEREAU, J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. **J. Immunol.**, v.167, p.5067-5076, 2001.

QI, H.; DENNING, T.L.; SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infect. Immun.**, v.71, p.3337-3342, 2003.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27, n.3, p.493-497, 1938.

REIS E SOUZA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v.11, p.392-399, 1999.

REY, J.; GARIN, N.; SPERTINI, F.; CORTHÉSY, B. Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. **J. Immunol.**, v.172, n.5, p.3026-3033, 2004.

ROBINS-BROWNE, R.M.; TZIPORI, S.; GONIS, G.; HAYES, J.; WITHERS, M.; PRPIC, J. K. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. **J. Med. Microbiol.**, v.19, p.297-308, 1985.

ROMAGNANI, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.227-257, 1994.

ROSQVIST, R.; BOLIN, I.; WOLF-WATZ, H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. **Infect Immun.**, v.56, p.2139-2143, 1988.

ROSQVIST, R.; FORSBERG, A.; WOLF-WATZ, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. **Infect. Immun.**, v.59, p.4562-4569, 1991.

ROSSI, M.; YOUNG, J.W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **J. Immunol.**, v.175, p.1373-1381, 2005.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; LAFONT, V.; MANGEAT, P.; HEESEMANN, J.; ROUOT, B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 65, p.4813-4821, 1997.

RUCKDESCHEL, K.; ROGGENKAMP, A.; SCHUBERT, S.; HEESEMANN, J. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. **Infect. Immun.**, v.64, p.724-733, 1996.

RUEDL, C.; HUBELE, S. Maturation of Peyer's patch dendritic cells in vitro upon stimulation via cytokines or CD40 triggering. **Eur. J. Immunol.**, v.27, p.1325-1330, 1997.

RUEDL, C.; RIESER, C.; BÖCK, G.; WICK, G.; WOLF, H. **Eur. J. Immunol.** v.26, n.8, p.1801-1806, 1996.

SALIO, M.; CELLA, M.; SUTER, M.; LANZAVECCHIA, A. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. **Eur. J. Immunol.**, v.29, p.3245-3253, 1999.

SATO, A.; IWASAKI, A. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.62, p.1333-1338, 2005.

SAUVONNET, N.; LAMBERMONT, I.; VAN DER BRUGGEN, P.; CORNELIS, G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Mol. Microbiol.**, v.45, p.805-815, 2002a.

SAUVONNET, N.; PRADET-BALADE, B.; GARCIA-SANZ, J.A.; CORNELIS, G.R. Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.25133-25142, 2002b.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; GILLESSEN, S.; FORSTER, R.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.100, p.1354-1361, 2002.



SCHESSER, K.; SPIIK, A.K.; DUKUZUMUREMYI, J.M.; NEURATH, M.F.; PETTERSSON, S.; WOLF-WATZ H. The YopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. **Mol. Microbiol.**, v.28, p.1067-1079, 1998.

SCHOPPET, M.; BUBERT, A.; HUPPERTZ, H.I. Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. **Clin. Exp. Immunol.**, v.122, p.326-323, 2000.

SCHOPPET, M.; HUPPERTZ, H.I. Differential stimulation of helper and cytotoxic T cells by dendritic cells after infection by *Yersinia enterocolitica* in vitro. **Cell Immunol.**, v.208, p.43-51, 2001.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Rev. Immunol.**, v.2, p.151-161, 2002.

SIMONET, M.; RICHARD, S.; BERCHE, P. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. **Infect. Immun.**, v.58, p.841-845, 1990.

SKRZYPEK, E.; MYERS-MORALES, T.; WHITEHEART, S.W.; STRALEY, S.C. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, v.71, p.937-947, 2003.

SOLBACH, W. Tumor-promoting phorbol esters selectively abrogate the expression of T4 differentiation antigen expressed on normal and malignant (Sézary) T helper lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v.156, p.1250-1255, 1982.

SOUZA, C.R.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v.11, p.392-399, 1999.

STEINMAN, R.M.; HAWIGER, D.; NUSENWEIG, M.C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.21, p.685-711, 2003.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.180, p.783-793, 1994.

SZABOLCS, P.; AVIGAN, D.; GEZELTER, S.; CIOCON, D.H.; MOORE, M.A.S.; STEINMAN, R.M.; YOUNG, J.W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. **Blood**, v.87, p.4520-4530, 1996.

TANSINI, A. **Influência da infecção por *Yersinia pseudotuberculosis* sobre o comportamento de macrófagos e células dendríticas**. 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

TRÜLZSCH, K.; GEGINAT, G.; SPORLEDER, T.; RUCKDESCHEL, K.; HOFFMANN, R.; HEESEMANN, J.; RUSSMANN, H. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. **J. Immunol.**, v. 174, p.4244-4251, 2005.

TZIPORI, S.; ROBINS-BROWNE, R.; PRPIC, J.K. Studies on the role of virulence determinants of *Yersinia enterocolitica* in gnotobiotic piglets. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v.9, p.233-238, 1987.

URBAN, B.C.; FERGUSON, D.J.; PAIN, A.; WILLCOX, N.; PLEBANSKI, M.; AUSTYN, J.M.; ROBERTS, D.J. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v.400, p.73-77, 1999.

OVERTVELT, L.V.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, v.67, p.4033-4040, 1999.

WEINER, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol. Rev.**, v.182, p.207-214, 2001.

WUORELA, M.; GRANFORS, K. Infectious Agents as Triggers of reactive arthritis. **Am. J. Med. Sci.**, v.316, n.4, p.264-270, 1998.

YAO, T.; MECSAS, J.; HEALY, J.I.; FALKOW, S.; CHIEN, Y. Supression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, YopH. **J. Exp. Med.**, v.190, p.1343-1350, 1999.

YEH, E.T.; GONG, L.; KAMITANI, T. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. **Gene**, v.248, p.1-14, 2000.

YIN, Z.; BRAUN, J.; NEURE, L.; WU, P.; LIU, L.; EGGENS, U.; SIEPER, J. Crucial role of interleukin-10/ interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.40, p.1788-1797, 1997.

ZHAO, Y.; LAJOIE, G.; ZHANG, H.; CHIU, B.; PAYNE, U.; INMAN, R.D. Tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice respond to acute *Yersinia enterocolitica* infection with less apoptosis and more effective host resistance. **Infect. Immun.**, v.68, n.3, p.1243-1251, 2000.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Parecer nº 07/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 01/2006 – Animais em Pesquisa

Interessado: ORIVALDO PEREIRA RAMOS

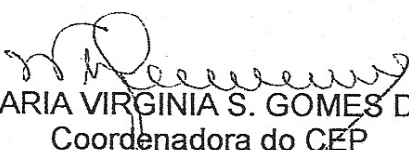
Orientador: Profa. Dra. BEATRIZ MARIA MACHADO DE MEDEIROS

Título do Projeto: Influência das células dendríticas na modulação das respostas Th1/Th2 em camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis*

### Parecer nº 07/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Influência das células dendríticas na modulação das respostas Th1/Th2 em camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis*", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 22 de fevereiro de 2006.

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA  
Coordenadora do CEP